



Philipps-Universität Marburg
Fachbereich Biologie
- Genetik -

**Die dynamische Regulation der kleinen GTPase Rac1
während des polaren Wachstums von
*Ustilago maydis***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Sonja Helene Frieser
aus Wiesbaden

Marburg/Lahn, Juli 2011

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am:

Gutachter der Arbeit:

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker

Zweitgutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch

Tag der mündlichen Prüfung am:

Die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Untersuchungen wurden von November 2006 bis März 2011 am Fachbereich Biologie, Abteilung Molekulare Genetik der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Bölker durchgeführt.

Teile dieser Arbeit sind in den folgenden Artikeln veröffentlicht:

Frieser, S. H., Hlubek, A., Sandrock, B. and Bölker, M. (2011).
Cla4 kinase triggers destruction of the Rac1-GEF Cdc24 during polarized growth in
Ustilago maydis. *Mol Biol Cell* (akzeptiert am 01.07.2011)

Frieser, S. H., Bauer, A., Przybilla, S., Sandrock, B. and Bölker, M.
Spatiotemporal Regulation of Rac1 activity in *Ustilago maydis*. (in Vorbereitung)

**Das schönste Glück des
denkenden Menschen ist:
das Erforschliche erforscht
zu haben und das Unerforschliche
ruhig zu verehren.**

- J. W. v. Goethe -

Für meine Mutter

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	vi
1 Einleitung	1
1.1 Der phytopathogene Brandpilz <i>Ustilago maydis</i>	1
1.1.1 Der Lebenszyklus von <i>Ustilago maydis</i>	1
1.2 Die kleinen GTPasen Rac1 und Cdc42 in der Regulation der Zellpolarität von Eukaryoten	3
1.2.1 Die Regulation kleiner GTPasen	3
1.2.2 Mechanismen zur Generierung der Signalspezifität kleiner GTPasen	5
1.2.3 Rac1 und Cdc42 in der Regulation der Zellpolarität höherer Eukaryoten	6
1.2.4 Rac1 und Cdc42 in Pilzen	9
1.2.5 In der Bäckerhefe und der Spaltheife ist Cdc42 der Hauptregulator des polaren Wachstums	11
1.2.6 Cdc42 und Rac1 in <i>Ustilago maydis</i>	15
1.3 Zielsetzung der Arbeit	19
2 Ergebnisse	21
2.1 Die Aktivität des Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1 Signalmoduls wird während des polaren Wachstums von <i>Ustilago maydis</i> durch eine negative Rückkopplungsschleife reguliert	21
2.1.1 Ein Signalmodul aus Cdc24, Rac1, Cla4 und Bem1 reguliert das polare Wachstum in <i>U. maydis</i>	21
2.1.2 Das Kreuzungstyp-abhängige filamentöse Wachstum von <i>U. maydis</i> basiert auf der Cdc24-abhängigen Aktivierung von Rac1	26
2.1.3 Die b-abhängige Filamentinduktion wird durch einen Abbau von Cdc24 begleitet	27
2.1.4 Die Bildung eines Cdc24/Rac1/Bem1/Cla4 Komplexes ist für die negative Regulation von Cdc24 essentiell	31

2.1.5	Die Phosphorylierung von Cdc24 durch Cla4 führt zum Abbau des GEFs	32
2.2	Die Aktivität des Bem1/Rac1-GTP/Cla4 Signalmoduls wird durch GAP-Aktivität, den GDI Rdi1 und aktinvermittelte Endozytose auf die Filamentspitze beschränkt	38
2.2.1	Drei GTPase aktivierende Proteine regulieren während des polaren Wachstums die Rac1-GTPase Aktivität	38
2.2.2	Der Guanin-Nukleotid Dissoziations Inhibitor Rdi1 stellt inaktives Rac1-GDP zur erneuten Aktivierung zu Verfügung	42
2.2.3	Das Entfernen von Rac1-GDP aus der Membran wird durch die aktinabhängige Endozytose während des polaren Wachstums unterstützt	45
2.2.4	Rac1 muss GTP hydrolysieren und mit Rdi1 interagieren können, um das polare Wachstum zu stimulieren	46
2.3	Die selektive Aktivierung durch Cdc24 bestimmt die Rac1-Signalspezifität	49
2.3.1	Rac1 und Cdc42 haben in <i>U. maydis</i> spezifische und redundante Funktionen	49
2.3.2	Die Mutante Cdc42 ^{F56W} gewinnt Rac1-Signalspezifität und verliert Cdc42-Funktionalität	53
3	Diskussion	56
3.1	Dynamische Regulation des Cdc24/Bem1/Rac1/Cla4 Signalmoduls . .	56
3.1.1	Die Cla4 abhängige Phosphorylierung von Cdc24 induziert den Abbau des GEFs	56
3.1.2	Der Abbau von Cdc24 beschränkt die Aktivität des Bem1/Rac1-GTP/Cla4 Signalmoduls auf die wachsende Spitze	57
3.1.3	Die Inaktivierung des Bem1/Rac1-GTP/Cla4 Komplexes während des polaren Wachstums	59
3.1.4	Die bW/bE-abhängige Aktivierung von Cdc24	64
3.2	Die selektive Aktivierung durch Cdc24 bestimmt die Rac1-Signalspezifität	65
3.2.1	Rac1 und Cdc42 haben eine gemeinsame essentielle Funktion . .	65
3.2.2	Die Generierung der Rac1-Signalspezifität hängt von Cdc24 ab .	66
3.3	Ausblick	67
4	Material und Methoden	68
4.1	Stämme	68
4.1.1	<i>E. coli</i> Stämme	68
4.1.2	<i>S. cerevisiae</i> Stämme	68
4.1.3	<i>Ustilago maydis</i> Stämme	68

Inhaltsverzeichnis

4.2	Vektoren	69
4.3	Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten <i>U. maydis</i> Stämme	70
4.3.1	Ektopische Expression von GFP-, RFP-, Myc- und 3xHA- Fusionsproteinen im <i>ip</i> Locus und im <i>nar1</i> Locus von <i>Ustilago maydis</i>	70
4.3.2	Ektopische Überexpression von Genen im <i>ip</i> Locus von <i>U. maydis</i>	72
4.3.3	Herstellung von Deletionsmutanten in <i>Ustilago maydis</i>	73
4.3.4	Herstellung konditionaler Mutanten	75
4.3.5	Konstrukte zur Herstellung N- und C-terminaler 3xHA-Fusionen am genomischen Locus	76
4.3.6	Konstruktion des Testsystems zur Identifikation des für den Cdc24-Abbau ausreichenden Fragments	77
4.3.7	Konstrukte zur Deletion von einzelnen Bereichen innerhalb eines ORFs	79
4.3.8	Einführung von Punktmutationen	80
4.3.9	Konstrukte zur Überexpression von <i>U. maydis</i> Proteinen in <i>E. coli</i>	82
4.4	Methoden	83
4.4.1	Kultivierung von Mikroorganismen	83
4.4.2	Isolierung von Nukleinsäuren	84
4.4.3	Analyse und Modifikation von Nukleinsäuren	85
4.4.4	Transformation von Mikroorganismen	89
4.4.5	Proteinbiochemische Methoden	90
4.4.6	Infektion von <i>Zea mays</i>	94
4.4.7	Mikroskopie von <i>U. maydis</i> -Zellen	94
4.5	Genutzte Kits, Chemikalien und Enzyme	95
4.5.1	Allgemeine Materialien	95
4.5.2	Kits	95
4.5.3	Chemikalien	95
4.5.4	Enzyme	98
	Literaturverzeichnis	99
	Abkürzungen	112
	Danksagung	114

Abbildungsverzeichnis

1.1	Erscheinungsformen von <i>Ustilago maydis</i>	1
1.2	Der Lebenszyklus von <i>Ustilago maydis</i>	2
1.3	Die Regulation der Aktivität kleiner GTPasen	4
1.4	Rho-GTPasen stehen im Zentrum von komplexen Signalnetzwerken . .	6
1.5	Beispiele für Cdc42/Rac1 abhängige Polarisierungsprozesse in höheren Eukaryoten	7
1.6	Wichtige Effektoren von Cdc42 und Rac1 in höheren Eukaryoten	9
1.7	Rac1 ging während der Evolution der Pilze zweimal unabhängig verloren	10
1.8	Regulatorische Proteine und Effektoren von Cdc42 in <i>S. cerevisiae</i> . . .	12
1.9	Regulatorische Proteine und Effektoren von Cdc42 in <i>S. pombe</i>	14
1.10	Rac1 reguliert in <i>U. maydis</i> das polare Wachstum und Cdc42 die Bildung des sekundären Septums	16
1.11	Rho-GEFs in <i>U. maydis</i>	17
1.12	Rho-GAPs in <i>U. maydis</i>	18
2.1	Eine durch Bem1 koordinierte lineare Signalkaskade reguliert die Zellpolarität in <i>U. maydis</i>	22
2.2	Cdc24, Bem1 und Cla4 lokalisieren in kooperativer Weise an der polar wachsenden Spitze	23
2.3	Bem1, Cdc24, Rac1 und Cla4 bilden einen Multiproteinkomplex	25
2.4	Die Filamentinduktion führt zu einem erhöhten Level von aktivem Rac1-GTP	27
2.5	Cdc24 wird während der vom <i>b</i> -Kreuzungstyp abhängigen Filamentinduktion degradiert	28
2.6	Die negative Rückkopplungsregulation von Cdc24 hängt von der Bildung eines funktionalen Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1 Signalmoduls ab	30
2.7	Der Abbau von Cdc24 hängt während des filamentösen Wachstums von der Cla4 Kinaseaktivität ab	32

Abbildungsverzeichnis

2.8	Der Bereich zwischen PH- und PB1-Domäne wird durch Cla4 Aktivität phosphoryliert und abgebaut	34
2.9	Eine Region von 62 Aminosäuren ist für den Cla4-induzierten Abbau von Cdc24 erforderlich	36
2.10	Die Expression einer stabilisierten Cdc24 Variante interferiert mit der Induktion des filamentösen Wachstums	37
2.11	Drei GTPase aktivierende Proteine (GAPs) haben Einfluss auf die Zellpolarität von <i>U. maydis</i>	39
2.12	Die Rac1-GAPs zeigen unterschiedliche Lokalisationsmuster	40
2.13	Die Deletion der Rac1-GAPs hat eine Bem1-abhängige stabilisierende Wirkung auf die Cdc24 Konzentration	41
2.14	Rdi1 ist ein Regulator der Zellpolarität in <i>U. maydis</i>	43
2.15	Rdi1 hat einen Rac1-abhängigen Einfluss auf die Stabilität von Cdc24	44
2.16	Die Inhibition der aktinabhängigen Endozytose hat einen stabilisierenden Effekt auf die Cdc24 Konzentration	46
2.17	Rac1 muss seine GDP-gebundene Konformation durchlaufen und mit Rdi1 interagieren können, um Cdc24 zu destabilisieren	47
2.18	Rac1 ^{Q61L} benötigt die Interaktion mit Rdi1 und Bem1, um seine Wirkung zu entfalten	48
2.19	Cdc24 aktiviert Rac1 und Cdc42 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> , Rac1 jedoch mit höherer Präferenz	50
2.20	Die essentielle Funktion von Cdc24 hängt von seiner GEF Aktivität ab	51
2.21	Weder das Gerüstprotein Bem1, noch die Effektoren Cla4 und Ste20 diskriminieren zwischen Cdc42 und Rac1	52
2.22	Die Mutante Cdc42 ^{F56W} gewinnt Rac1-Signalspezifität, verliert jedoch ihre Cdc42-Funktionalität	54
3.1	Schematisches Modell für die negative Rückkopplungsregulation des GEFs Cdc24	59
3.2	Drei Rac1-GAPs kontrollieren die Rezyklisierung von Bem1	61
3.3	Schematisches Modell für die zyklische Aktivierung und Deaktivierung von Rac1 während des polaren Spitzenwachstums	63
4.1	Fragmentierung von <i>cdc24</i> und Herstellung der Konstrukte zur Deletion einzelner Bereiche	78

Zusammenfassung

Die morphologische Transition von der Knospung zum filamentösen Wachstum ist ein charakteristisches Merkmal vieler pathogener Pilze. Auch der Maisbrandpilz *Ustilago maydis* zeigt filamentöses Wachstum während seiner sexuellen Vermehrung. Daher kann er als gutes Modellsystem zum Studium der Mechanismen dienen, die dieser morphologischen Transition zugrunde liegen. Dabei hängt das filamentöse Wachstum von dem kleinen GTP-bindenden Protein Rac1 und seinem Effektor, der p21-aktivierten Kinase Cla4 ab. Kleine GTP-bindende Proteine der Rho-Familie werden durch Guaninnukleotid Austauschfaktoren (GEFs) aktiviert und durch GTPase aktivierende Proteine inaktiviert. Guaninnukleotid Dissoziationsinhibitoren (GDIs) können die Rho-GTPasen aus der Membran extrahieren und im Zytosol zurückhalten. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die durch den *b* Kreuzungstyp kontrollierte morphologische Transition von *U. maydis* zur Stimulation der Rac1-Aktivität durch den GEF Cdc24 führt. Während des polaren Wachstums rekrutiert Cdc24 Rac1 in einen durch das Gerüstprotein Bem1 koordinierten Komplex mit Cla4, der an der polar wachsenden Spitze lokalisiert. Die Komplexbildung führt zur Degradierung von Cdc24, die durch die Cla4-abhängige Phosphorylierung des GEFs induziert wird. Die Expression von stabilisierten Cdc24 Varianten interferiert mit dem filamentösen Wachstum und der Pflanzeninfektion, was auf eine bedeutende Rolle des Cdc24 Abbaus während des polaren Wachstums von *U. maydis* hinweist. Es kann gefolgert werden, dass die Degradierung von Cdc24 die Aktivität des Bem1/Rac1-GTP/Cla4 Komplexes auf die apikale Wachstumszone beschränkt. Diese negative Rückkopplungsregulation ist von der Fähigkeit von Rac1 abhängig, zwischen der inaktiven GDP-gebundenen Konformation und dem aktiven GTP-gebundenen Zustand zu wechseln. Aus diesem Grund wurden die distinkten Funktionen von drei Rac1-GAPs und dem GDI Rdi1 während des polaren Wachstums untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die GAP-katalysierte Inaktivierung des Bem1/Rac1-GTP/Cla4 Komplexes und die Internalisierung von membrangebundenem Rac1 durch Rdi1, in Zusammenarbeit mit der aktinabhängigen Endozytose, für das polare Spitzenwachstum von essentieller Bedeutung sind.

Die Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 sind eng verwandte hoch konservierte Regulator-

Zusammenfassung

ren des Zytoskeletts und haben in *U. maydis* spezifische Funktionen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Rac1 im Komplex mit Bem1 und Cla4 durch die Mutante Cdc42^{F56W}, die eine hohe Affinität zu Cdc24 besitzt, substituiert werden kann. Daraus lässt sich folgern, dass während des polaren Wachstums von *U. maydis* allein die selektive Aktivierung durch den GEF Cdc24 bestimmt, welches Rho-Protein als zentrale GTPase des Signalmoduls fungiert.

1 Einleitung

1.1 Der phytopathogene Brandpilz *Ustilago maydis*

Ustilago maydis ist einer der bekanntesten und bestuntersuchten Vertreter der Ordnung der Brandpilze (Ustilaginales) aus dem Phylum der Basidiomycota, das zu der Klasse der Teliomycetes gehört. Brandpilze sind fakultativ biotrophe phytopathogene Pilze, die hauptsächlich Gräser oder Getreide befallen und dadurch erheblichen landwirtschaftlichen Schaden anrichten können (Brefort et al., 2009). Das Wirtsspektrum von *U. maydis* ist auf Mais und dessen Wildform, Teosinte, beschränkt. Die Infektion kann an allen überirdischen Pflanzenteile erfolgen. Dies führt zur Ausbildung von Gallen, in denen sich die Sporen des Pilzes entwickeln. Von *U. maydis* befallene Maiskolben werden in Mexico als Delikatesse unter dem Namen „Huitlacoche“ angeboten (Abb. 1.2).



Abbildung 1.1: Erscheinungsformen von *Ustilago maydis*. A) Im Labor: haploide Sporidien von *U. maydis*, die sich normalerweise im Boden durch Knospung vermehren. B) Auf dem Maisfeld: mit *U. maydis* infizierte Maiskolben (Quelle: www.mexicoguru.com). C) Im Supermarkt: Huitlacoche Dose. D) Im Restaurant: Huitlacoche als Mahlzeit zubereitet (Quelle C) und D): www.thesneeze.com).

1.1.1 Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis*

U. maydis ist ein dimorpher Pilz und wechselt in seinem Lebenszyklus zwischen der nichtpathogenen haploiden Form und dem pathogenen Dikaryon. Im haploiden Stadium vermehren sich die Zellen vegetativ durch Knospung (Abb. 1.2 A). Die Zellteilung erfolgt durch die Bildung eines primären und eines sekundären Septums. In der

1 Einleitung

Fragmentierungszone zwischen den Septen wird durch Vakuolisierung des Zytoplasmas die Tochterzelle von der Mutterzelle abgelöst (Banuett and Herskowitz, 2002; Weinzierl et al., 2002; Schink and Bölker, 2009). Der Übertritt in das sexuelle Stadium wird durch die Fusion zweier Zellen eingeleitet, die in ihren Paarungstypen kompatibel sind. Die Paarungstypen von *U. maydis* werden durch zwei unabhängige genetische Loci bestimmt, *a* und *b* (Banuett and Herskowitz, 1989). Der biallelische *a* Locus kodiert für ein pheromonabhängiges Zell-Zell Erkennungssystem, wobei der Rezeptor des einen Kreuzungspartners das spezifische Pheromon des anderen Kreuzungstyps erkennt (Bölker et al., 1992). Die Wahrnehmung des Kreuzungspartners führt zur Ausbildung von Paarungshyphen entlang des Pheromongradienten, die an der Spitze zum dikaryotischen Filament fusionieren (Snetselaar et al., 1996) (Abb. 1.2 B). Der multiallelische *b* Locus kodiert für zwei Homeodomänen-Proteine, bWest (bW) und bEast (bE) (Schulz et al., 1990). In dikaryotischen Zellen mit unterschiedlichen *b* Allelen kommt es zur Heterodimerisierung der bEast und bWest Proteine. Dieses Heterodimer agiert als Transkriptionsfaktor, der den Prozess des filamentösen Wachstums und der pathogenen Entwicklung kontrolliert (Kämper et al., 1995; Romeis et al., 1997). Ohne ein

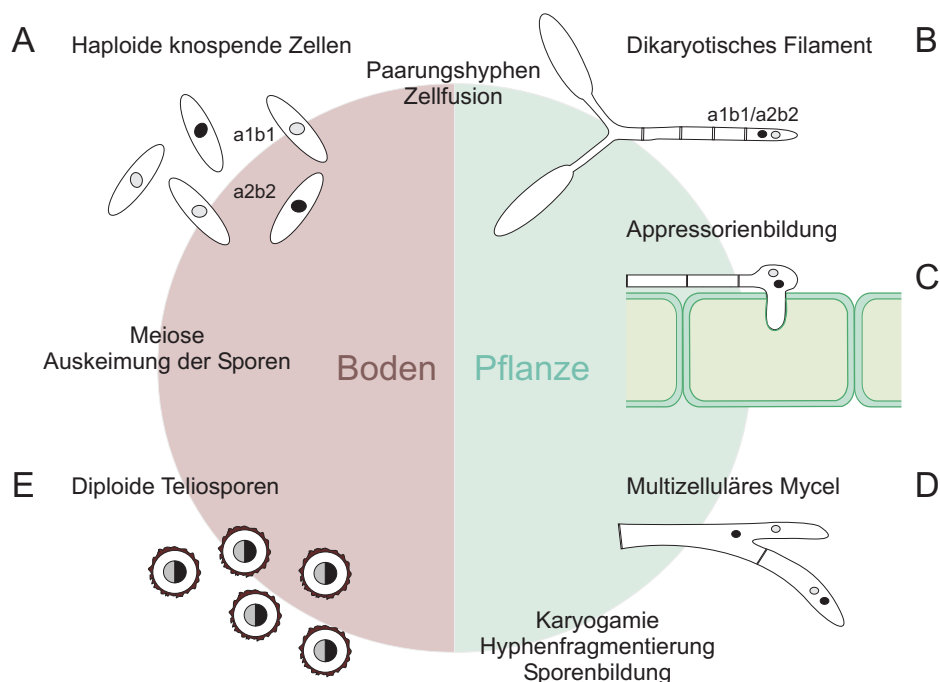


Abbildung 1.2: Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis*. **A)** Haploide Sporidien vermehren sich im Boden durch Knospung. **B)** Sporidien mit unterschiedlichen *a* und *b* Kreuzungstypen (z.B. a1b1 und a2b2) können auf der Blattoberfläche fusionieren und ein dikaryotisches Filament bilden. **C)** Durch die Ausbildung von Appressorien kommt es zur Penetration der Pflanze. **D)** In der Pflanze bildet sich ein multizelluläres Mycel. **E)** In den induzierten Planzengallen kommt es zur Karyogamie und Sporenbildung. Durch Aufbrechen der Gallen werden die diploiden Teliosporen freigesetzt. Unter geeigneten Bedingungen kommt es zur Meiose und dem Auskeimen der Sporen.

aktives bW/bE Heterodimer ist die Ausbildung eines stabilen Dikaryons nicht möglich. Das induzierte Filament wird durch die Ausbildung eines distalen Septums von den gepaarten Zellen abgeteilt (Abb. 1.2 B). Das dikaryotische Filament zeichnet sich durch polares Spitzenwachstum aus. Zu diesem Zweck muss permanent Zellwandmaterial an die Spitze gebracht werden. Am distalen Ende der Hyphe bleiben entleerte, durch Septen begrenzte, Abschnitte zurück. Die Pilzhyphe dringt mit Hilfe von Appressorien in die Pflanze ein (Brefort et al., 2009) (Abb. 1.2 C). In der Pflanze kommt es zur Ausbildung eines verzweigten Hyphengeflechtes im Apoplast. Dies führt zu einer Anregung der Teilungsaktivität des meristematischen Gewebes der Wirtspflanze. In den sich dadurch ausbildenden Gallen findet die Sporulation statt, die durch die Karyogamie eingeleitet und durch die Bildung der dunkel pigmentierten Teliosporen abgeschlossen wird (Banuett and Herskowitz, 1994, 1996) (Abb. 1.2 E). Diese sehr widerstandsfähigen Strukturen werden nach dem Aufbrechen des Tumors durch Wind und Regen verbreitet und können Jahre überdauern. Im Falle des Auskeimens bildet sich ein kurzes Promycel, in dem die Meiose stattfindet. Es entwickelt sich ein septiertes Filament, wobei sich jeweils ein haploider Kern in jedem der Abschnitte befindet. Durch Knospung werden aus dem Promycel einzelne haploide Zellen abgeschnürt (Tippit et al., 1984) (Abb. 1.2 A).

1.2 Die kleinen GTPasen Rac1 und Cdc42 in der Regulation der Zellpolarität von Eukaryoten

Die Form einer Zelle ist das Resultat des zellulären Wachstums, dass in vielen Fällen asymmetrisch ist. Solch polarisiertes Wachstum ist eine fundamentale Voraussetzung für die Entwicklung von unizellulären und multizellulären Organismen. Für den Aufbau von Polaritätsachsen in einer Zelle ist im Wesentlichen das Zytoskelett verantwortlich. Die asymmetrische Organisation sowohl des Aktin-, als auch des Mikrotubuli-Zytoskeletts wird durch GTPasen der Rho-Familie reguliert.

1.2.1 Die Regulation kleiner GTPasen

Die feinabgestimmte Regulation der Aktivität kleiner GTPasen ist für ihre zellulären Aufgaben essentiell. Störungen dieser Mechanismen, z.B. durch Mutationen, führen in Säugetieren und im Menschen nicht selten zu unkontrollierten Zellwucherungen und zur Tumorentstehung (Iden and Collard, 2008). Ein vertieftes Verständnis der regulatorischen Prozesse, die die Aktivität von kleinen G-Proteinen kontrollieren, ist daher von großer wissenschaftlicher und medizinischer Bedeutung.

Alle kleinen G-Proteine besitzen eine hochkonservierte Domäne, die GTP binden und

zu GDP und P_i hydrolysieren kann (Bourne et al., 1991). In der GTP-gebundenen Form nehmen kleine GTPasen ihre aktive Konformation ein und können über spezifische Interaktionsdomänen mit ihren Effektorproteinen in Kontakt treten, wobei sie deren Aktivität regulieren (Bourne et al., 1990, 1991) (Abb. 1.3). In der GDP-gebundenen Form sind sie hingegen inaktiv (Gibbs et al., 1984). Da die intrinsische GTPase-Aktivität sehr gering ist, ist die GTP-gebundene aktive Konformation stabil. Damit es zu einer Überführung in die inaktive, GDP-gebundene Konformation kommt, werden sogenannte GTPase aktivierende Proteine (GAPs) benötigt, die durch ihre Interaktion mit den kleinen GTP-bindenden Proteinen deren intrinsische GTPase-Aktivität stimulieren (Cales et al., 1988; Bourne et al., 1990, 1991). Dabei interagiert eine konservierte basische Aminosäure des Rho-GAPs, der sogenannte Arginin-Finger, mit dem γ -Phosphat des gebundenen GTPs, wodurch dessen Hydrolyse stimuliert wird (Bourne, 1997; Rittinger et al., 1997b) (Abb. 1.3). Die Aktivierung der GTP-bindenden Proteine erfolgt durch Austausch von GDP zu GTP, wobei die Freisetzung des GDPs der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Eine schnelle Aktivierung erfordert die Interaktion mit Guaninnukleotid Austauschfaktoren (GEFs). GEFs katalysieren die GDP-Freisetzung und stabilisieren die GTPase in ihrer nukleotidfreien Form. Auf diese Weise wird die GTP-Bindung ermöglicht (West et al., 1990; Bourne et al., 1990) (Abb. 1.3). Rho-GTPasen werden hauptsächlich durch GEFs der Dbl-Familie aktiviert, für die ein Tandem aus der katalytischen Dbl-Homologie Domäne (DH) und der lipidinteragierenden Pleckstrin Homologie Domäne (PH) charakteristisch ist (Schmidt and Hall, 2002). Die Bindung der DH-Domäne an die GTPase führt zu einer Strukturänderung der Nukleotidbindestasche, wodurch die Magnesiumbindestelle blockiert wird, was das im Komplex mit

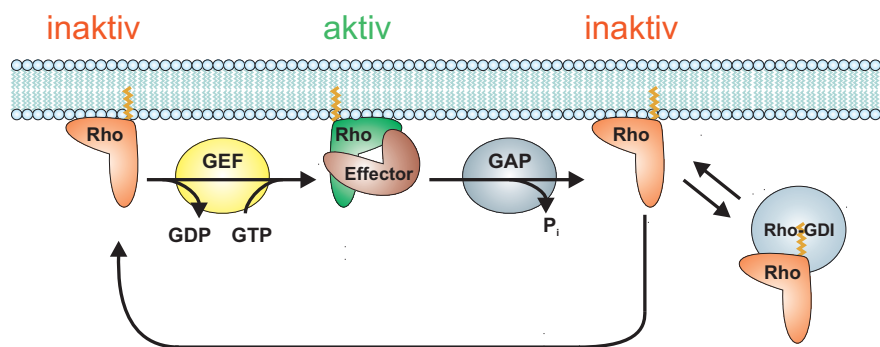


Abbildung 1.3: Die Regulation der Aktivität kleiner GTPasen. Die inaktive GDP-gebundene Form der GTPase wird durch Interaktion mit einem GEF, der den Nukleotidaustausch katalysiert, in den aktiven GTP-gebundenen Zustand überführt. Die aktive GTPase kann nun mit ihren Effektoren interagieren. Die Inaktivierung erfolgt durch Interaktion mit GAPs, die die intrinsische GTPase Aktivität stimulieren. GDIs können die GTPase durch Interaktion mit dem Membrananker reversibel im Zytosol halten.

Magnesium vorliegende GDP verdrängt. Bei der Inkorporation von GTP kommt es zur Umkehrung der GEF-induzierten Strukturänderung (Rossman et al., 2005). Die lipid-bindende PH-Domäne dient vermutlich der richtigen Positionierung der DH Domäne relativ zur GTPase an der Plasmamembran (Rossman et al., 2005).

In vielen GTPasen existieren C-terminale Strukturen, sogenannte „CAAX-Boxen“, welche z.B. durch Farnesylierung oder Palmitoylierung posttranslational modifiziert werden. Die Modifikationen führen zur Verankerung in der Zytoplasmamembran, die ein wichtiges Element der räumlichen Regulation von G-Proteinen darstellt (Glomset and Farnsworth, 1994; Zhang and Casey, 1996). Für die Regulation von Mitgliedern der Rho/Rac/Cdc42-Familie existieren neben den schon beschriebenen GEFs und GAPs noch weitere Regulationsfaktoren, die Guaninnukleotid Dissoziationsinhibitoren (GDIs), die eine hydrophobe Bindetasche besitzen. Über diese interagieren sie mit der C-terminalen Prenylmodifikation der GTPasen, um diese aus der Membran herauszulösen (Sasaki et al., 1990; Wu et al., 1996b; Seabra and Wasmeier, 2004) (Abb. 1.3). Die Abtrennung der GDI-Regulatoren aus dem cytosolischen Komplex mit der inaktiven GTPase geschieht durch GDI-Dissoziationsfaktoren wie z.B. den ERM Proteinen (Ezrin, Radixin, Moesin), die an GDIs binden und deren Aktivität verringern (Takahashi et al., 1997).

1.2.2 Mechanismen zur Generierung der Signalspezifität kleiner GTPasen

Eines der grundlegenden Probleme bei der Untersuchung der Signalweiterleitung durch Rho-GTPasen ist die Frage, wie innerhalb eines GEF/GTPase/Effektor Signalmoduls sichergestellt wird, dass das den GEF aktivierende Signal mit der korrekten zellulären Antwort verknüpft wird. Eine GTPase der Rho-Familie kann in der Regel von mehr als einem GEF aktiviert werden und ihrerseits mit mehr als einem Effektor interagieren, also auch mehr als eine zelluläre Antwort erzeugen (Abb. 1.4). Die Signalspezifität kann in einem solch komplexen Netzwerk durch verschiedene Mechanismen sichergestellt werden. Die GEF-GTPase Erkennung ist, wie auch die GTPase-Effektor Erkennung oft hochspezifisch. Eine besondere Rolle spielt dabei die Aminosäure an Position 56 in Cdc42 (Phenylalanin) und Rac1 (Tryptophan). Es konnte gezeigt werden, dass GEFs der Dbl-Familie über diese Aminosäure zwischen Cdc42 und Rac1 diskriminieren (Gao et al., 2001; Karnoub et al., 2001; Snyder et al., 2002; Hlubek et al., 2008). Zudem liegt diese Aminosäure in der Effektorbindeschleife der GTPase, wo sie auch die Bindung von spezifischen Effektoren beeinflussen kann (Karnoub et al., 2001). In vielen Fällen ist jedoch die Bindung von GTPase Interaktoren relativ unspezifisch. In einem solchen Fall wird die korrekte Interaktion von GEF, GTPase und Effektor in einem Multiproteinkomplex mit einem Gerüstprotein sichergestellt (Marinissen and Gutkind,

1 Einleitung

2005; García-Mata and Burridge, 2007). In seltenen Fällen kann auch der GEF selbst als Gerüstprotein fungieren und so die Aktivierung des richtigen Effektors sicherstellen, wie es z.B. bei dem Endozytosegerüstprotein Intersectin der Fall ist (García-Mata and Burridge, 2007). Eine weitere Möglichkeit, Signalspezifität zu generieren, kann auch die spezifische Expression oder Lokalisation der mit der GTPase interagierenden Proteine sein, die die Aktivierung von GTPase und Effektor auf einen bestimmten Zelltyp oder ein Kompartiment beschränkt (García-Mata and Burridge, 2007).

Wie man zwischen diesen verschiedenen Szenarien der Spezifitätsgenerierung in einem konkreten Signalmodul unterscheiden kann und darüber zu einem vertieften Verständnis der Signalweiterleitung gelangt, ist eine der größten Herausforderungen beim Studium kleiner GTPasen.

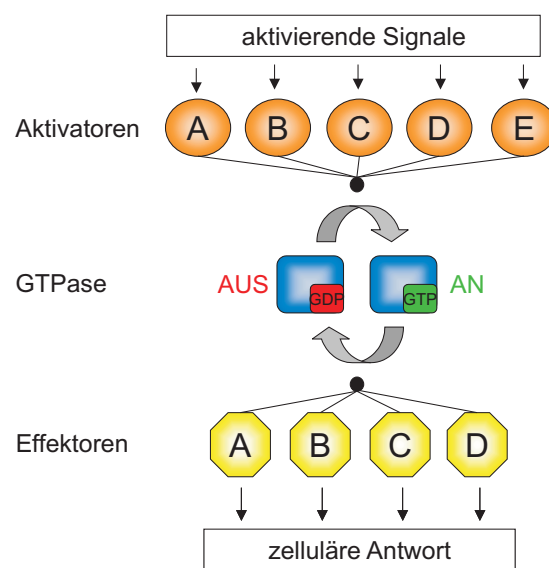


Abbildung 1.4: Rho-GTPasen stehen im Zentrum von komplexen Signalnetzwerken. Rho-GTPasen können häufig durch mehrere Aktivatoren stimuliert werden und interagieren ihrerseits mit mehr als einem Effektor. Ein molekularer Schalter bildet folglich das zentrale Element mehrerer Signalkaskaden, die unterschiedliche aktivierende Signale mit unterschiedlichen morphologischen Effekten verknüpfen. Die Spezifität eines solchen Signalmoduls kann sowohl auf der Seite der Aktivatoren, als auch auf der Seite der Effektoren generiert werden.

1.2.3 Rac1 und Cdc42 in der Regulation der Zellpolarität höherer Eukaryoten

Die Ausbildung und Aufrechterhaltung der korrekten Zellpolarität ist besonders für multizelluläre Organismen essentiell. Sie ist Voraussetzung für die Entwicklung der Zellmorphologie, aber auch für die Mobilität individueller Zellen (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Dabei sind Cdc42 und Rac1 zusammen mit RhoA zentrale Regulatoren, die das Zytoskelett organisieren. Das bestuntersuchte Beispiel für die Zusammenarbeit der

1 Einleitung

drei GTPasen ist die Zellmigration. Diese spielt z.B. bei dem Verschluss von Wunden in einem Zellgewebe eine wichtige Rolle, oder bei der Chemotaxis von Makrophagen (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Die Zellbewegung von Fibroblasten ist das Resultat der durch Cdc42 und Rac1 stimulierten Aktinpolymerisation, die zur Ausstülpung von Filopodien (Cdc42) und Lamellipodien (Rac1) in der Bewegungsrichtung führt und des RhoA induzierten Zurückziehens von Membran und Zellmatrix am rückwärtigen Zellende durch Stimulation der Aktin-Myosin Kontraktion (Raftopoulou and Hall, 2004) (Abb. 1.5 A). Die Etablierung einer stabilen Polaritätsachse wird dabei durch Polaritätskomplexe sichergestellt, die die GTPasen rekrutieren. Die drei bestuntersuchten Polaritätskomplexe sind in Säugern der Par- (partitioning defective), der Crumbs- und der Scribble- Komplex, wobei der Par-Komplex die vielfältigsten Funktionen ausübt (Iden and Collard, 2008). Der Par-Komplex, bestehend aus sechs Par (Par1-6) Proteinen und einer untypischen Proteinkinase C (Pkc3), spielt in *Caenorhabditis elegans* bei

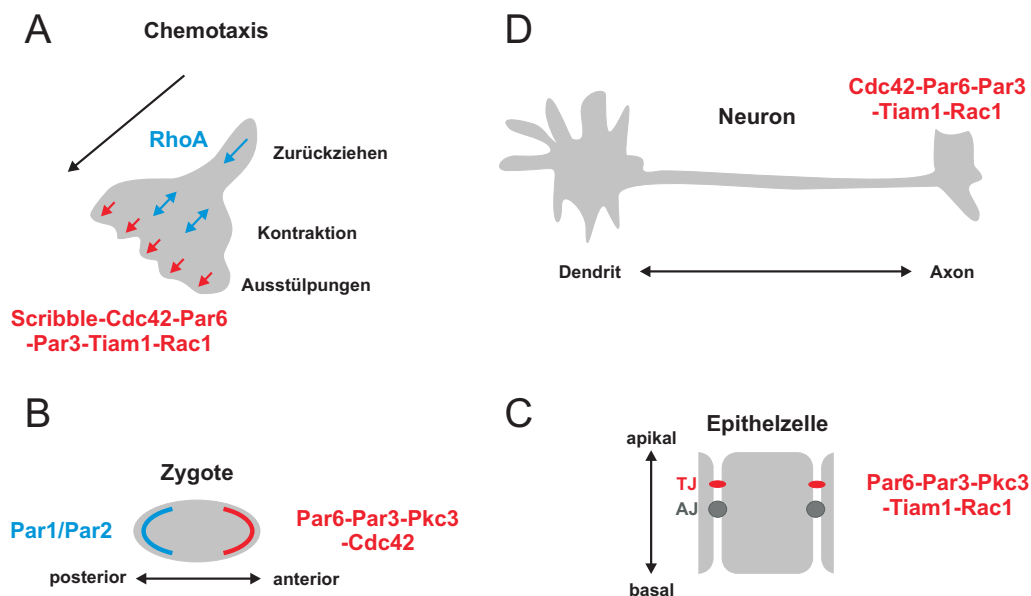


Abbildung 1.5: Beispiele für Cdc42/Rac1 abhängige Polarisierungsprozesse in höheren Eukaryoten. **A)** Polare Bewegung von Fibroblasten. Rac1 und Cdc42 lokalisieren mit Hilfe der Polaritätskomplexe Scribble und Par an der Zellfront. Dabei wird Rac1 durch Tiam1 aktiviert. Rac1 und Cdc42 initiieren die Bildung von Filopodien und Lamellipodien, wodurch es zur Fortbewegung kommt. Aktives RhoA lokalisiert hauptsächlich am rückwärtigen Zellende, wo es die Aktomyosinkontraktion reguliert. **B)** Die Etablierung der anterior-posterior Achse führt zur asymmetrischen Teilung der *C. elegans* Zygote. Par1 und Par2 lokalisieren am posterioren Zellpol, während Par6, Par3 und die alternative Pkc3 den anterioren Zellpol markieren. Cdc42 wird an den anterioren Pol rekrutiert und aktiviert. **C)** Während der Axon-Spezifikation führen externe Stimuli zur Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat an der Neuritenspitze, wodurch es Rab1-abhängig zur Aktivierung von Cdc42 kommt. Cdc42-GTP aktiviert den Par-Komplex, was zur Stimulierung von Rac1 durch Tiam1 führt. **D)** Apikal-basale Polarisierung von Epithelzellen. Dabei reguliert der Par6-Par3-Pkc3-Tiam1-Rac1 Komplex die Bildung von „tight junctions“ (TJ) und die Entwicklung eines vollständig polarisierten Epitheliums. Modifiziert nach (Etienne-Manneville and Hall, 2002).

1 Einleitung

der Etablierung der anterior-posterior Achse während der ersten Zellteilung der Zygote eine wichtige Rolle. Dabei lokalisieren Par1 und Par2 am posterioren Zellpol und Par3, Par6 und Pkc3 am anterioren Zellpol (Kemphues, 2000).

Anschließend kommt es zur Polarisierung des Aktomyosinnetzwerks zum anterioren Pol, wodurch ein kontraktiler anteriorer und ein nichtkontraktiler posteriorer Bereich entsteht (Cowan and Hyman, 2007). Vermutlich interagiert Cdc42 mit Par6, um Pkc3 zu stimulieren und verbindet die asymmetrische Lokalisation der Par Proteine mit der Polarisierung des Aktinmyosinnetzwerks (Joberty et al., 2000; Cowan and Hyman, 2007) (Abb. 1.5 B).

Bei der Etablierung der apikal-basalen Achse in Epithelzellen spielen neben dem Par-Komplex auch Cdc42 und Rac1 eine wichtige Rolle (Abb. 1.5 B). In Epithelien bilden Lamellipodien und Filopodien benachbarter Zellen miteinander vorläufige Verbindungen, an denen sich E-Cadherin anreichert (Ebnet et al., 2008). Dies führt zur Aktivierung von Rac1 und Cdc42 (Nakagawa et al., 2001; Kim et al., 2000). Rac1 spielt jedoch offenbar die bedeutendere Rolle bei der anschließenden Polarisierung der Zelle (Takaishi et al., 1997). Die Interaktion der GTPasen mit Par6 führt zur Aktivierung der alternativen Pkc (Yamanaka et al., 2001). Ein weiterer bedeutender Interaktionspartner des Par-Komplexes ist der Rac1 GEF Tiam1, der mit Par3 interagiert und so die Aktivität von Rac1 direkt mit dem Par-Komplex während der Ausbildung von „tight junctions“ verknüpft (Chen 2005, Mertens 2005) (Abb. 1.5 C). Die Interaktion von Tiam1 mit Par3 findet auch während der Spezifizierung von Axonen statt, wo der GEF die Rac1-abhängige Aktinreorganisation an der Axonspitze stimuliert. Eine Nervenzelle bildet zunächst Rac1- und Cdc42-abhängig Lamellipodien und Filopodien, die sich zu Neuriten entwickeln (Kozma et al., 1997). Durch externe Stimuli kommt es zur Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), was zur erhöhten lokalen Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat Konzentration an der Dendritenspitze führt. Dies aktiviert vermutlich die Ras-ähnliche GTPase Rab1, was letztendlich in der Stimulierung von Cdc42 resultiert (Schwamborn and Püschel, 2004). Aktives Cdc42 aktiviert den Par-Komplex, was eine Aktivierung von Rac1 durch Tiam zur Folge hat (Nishimura et al., 2005). Dieses Cdc42/Par6/Par3/Tiam1/Rac1 Modul ist einer der zentralen Regulatoren der Zellpolarität in Säugern und reguliert neben der Etablierung der Axonpolarität auch noch weitere Prozesse, wie z.B. die anterior-posterior Polarisierung von T-Zellen (Gérard et al., 2007).

Rac1 und Cdc42 regulieren die bisher beschriebenen Prozesse durch die Interaktion mit einer Vielzahl von Effektoren. Dabei sind viele dieser Interaktoren Kinasen (PAK, MRCK) oder Gerüstproteine (IQGAP, WASP, WAVE) (Abb. 1.6). Die Regulation der Aktinpolymerisation findet durch PAK (p21 activated kinase) Stimulation und durch Aktivierung von N-WASP (Neuronal Wiscott-Aldrich Syndrom Protein) und WAVE

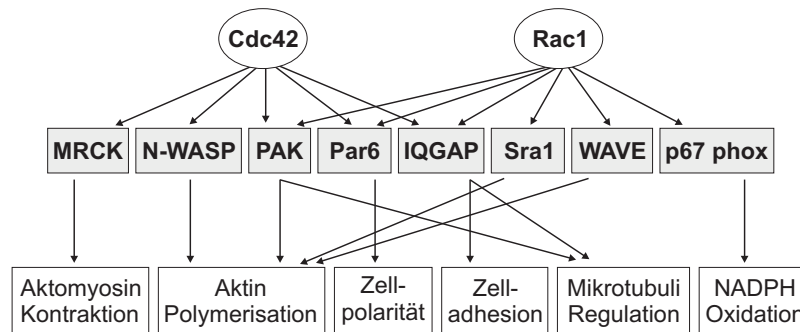


Abbildung 1.6: Wichtige Effektoren von Cdc42 und Rac1 in höheren Eukaryoten. Cdc42 und Rac1 regulieren die Zellpolarisation durch Stimulation der Aktomyosinkontraktion und der Aktinpolymerisation, sowie der Regulation der Mikrotubulistabilität. MRCK (Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase), N-WASP (Neuronal-Wiskott-Aldrich Syndrom Protein), PAK (p21 activated kinase), Par6 (partitioning defective 6), IQGAP (IQ motif-containing GTPase-activating protein), Sra1 (specifically Rac1-associated protein 1), WAVE (WASP family verprolin homologous protein), p67 phox (p67 phagocyte oxidase protein). Modifiziert nach (Iden and Collard, 2008).

(WASP-Familien-Verprolin-homologes Protein) statt. Die PAKs stimulieren aktinpolymerisierende und depolymerisierende Faktoren durch deren Phosphorylierung, wohingegen WASP und WAVE als Gerüstprotein für die aktinpolymerisierende Maschinerie dienen, in deren Zentrum der Arp2/3 Komplex steht (Prehoda et al., 2000).

Über die Aktivierung der GTPase Aktivität von Cdc42 und Rac1 während der Etablierung der Zellpolarität ist wenig bekannt. Es wurde beschrieben, dass der Cdc42-GAP Cdc42GAP während der Zellmigration am vorderen Zellende durch den Dynein Regulator Nudel inhibiert wird (Shen et al., 2008). Auch konnte gezeigt werden, dass der Rac1-GAP SH3BP1 über den Exozyt Komplex an die Zellfront rekrutiert wird, wo er Rac1 inaktiviert (Parrini et al., 2011). Der Rho-GDI1 ist ein weiterer Regulator von Cdc42 und Rac1. Der GDI kontrolliert die Homeostasis von Cdc42, Rac und Rho Proteinen, indem er mit ihnen nach ihrer Prenylierung am ER interagiert, sie löslich im Zytosol hält und so vor dem Abbau schützt (Boulter et al., 2010).

1.2.4 Rac1 und Cdc42 in Pilzen

Cdc42 und Rac1 sind eng verwandte und hoch konservierte Mitglieder der Familie der Rho-GTPasen, die über achtzig Prozent Sequenzhomologie zwischen Pilzen und Menschen aufweisen. Diese hohe Konservierung der Aminosäuresequenz für Rac1 und Cdc42 ist vermutlich auf ihre Beteiligung an zahlreichen komplexen biologischen Prozessen zurückzuführen. Obwohl so hoch konservierte Proteine normalerweise als unverzichtbar gelten (Pál et al., 2006), hat während der Evolution der Pilze offenbar ein zweimaliger Verlust von Rac1 stattgefunden (Abb. 1.7). Ausgerechnet zwei der prominentesten pilzlichen Modellorganismen, die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und die Spalthe-

1 Einleitung

fe *Schizosaccharomyces pombe* besitzen kein Rac Homolog (Perez and Rincón, 2010) (Abb. 1.7).

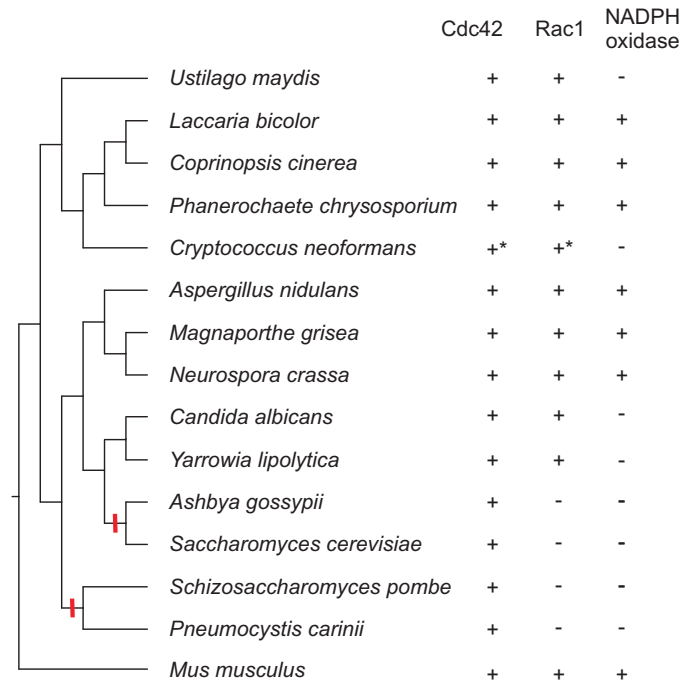


Abbildung 1.7: Rac1 ging während der Evolution der Pilze zweimal unabhängig verloren. Kladogramm von Pilzarten basierend auf ihrer 18 S rDNA-Sequenz. Die roten Balken markieren den Verlust von Rac1 während der Evolution. Die Sternchen zeigen die Anwesenheit zusätzlicher Cdc42, bzw. Rac1 Orthologe in *Cryptococcus neoformans* an.

In diesen beiden Organismen ist Cdc42 ein essentielles Protein (Perez and Rincón, 2010), während in den meisten filamentösen Pilzen Cdc42 nicht essentiell ist. *cdc42/rac1* Doppelmutanten sind jedoch nicht lebensfähig (Mahlert et al., 2006; Kwon et al., 2011; Virag et al., 2007). Dies lässt den Schluss zu, dass Cdc42 und Rac1 mindestens eine gemeinsame essentielle Funktion haben, bzw. einen gemeinsamen essentiellen Effektor aktivieren. Abgesehen von dieser Gemeinsamkeit variieren die Funktionen, die Rac1 und Cdc42 in den filamentösen Pilzen übernehmen, dramatisch, sogar zwischen sehr nah verwandten Arten. So ist Rac1 in *Aspergillus niger* ein Regulator des Hyphenwachstums, wohingegen diese Funktion in *Aspergillus nidulans* eher von Cdc42 ausgefüllt wird (Virag et al., 2007). In den Basidiomyceten *U. maydis* und *Cryptococcus neoformans* ist Rac1 der zentrale Regulator des filamentösen Wachstums, wohingegen Cdc42 bei der Regulation der Septierung eine wichtige Rolle spielt (Vallim 2005, Mahlert 2006, Ballou 2010).

Auch im Bezug auf die von Cdc42 und Rac1 aktivierten Effektoren herrscht im Reich der Pilze eine große Variabilität. Einer der am besten charakterisierten Effektoren, die p21-aktivierte Kinase Cla4, ist in *S. cerevisiae* ein Effektor für Cdc42, wohingegen sie

in *U. maydis* als Effektor von Rac1 beschrieben wurde (Mahlert et al., 2006). Ein weiterer, in Pilzen als Rac1 spezifisch beschriebener Interaktor, ist die NADPH Oxidase, ein Multiproteinkomplex, der der Generierung von reaktiven Sauerstoffarten (ROS) dient (Chen et al., 2008; Takemoto et al., 2011). Interessanterweise, ist dieser Effektor in den Pilzen, die kein Rac1 Homolog besitzen, nicht vorhanden (Abb. 1.7).

1.2.5 In der Bäckerhefe und der Spaltheife ist Cdc42 der Hauptregulator des polaren Wachstums

Das Verständnis dafür, wie zelluläre Komponenten in einem einzelligen Organismus eine Polaritätsachse etablieren können, ist in den Ascomyceten, vor allem in den Bäckerhefe *S. cerevisiae* und in der Spaltheife *S. pombe* sehr weit fortgeschritten. Die Schlüsselmechanismen der Polaritätsetablierung sind in beiden Organismen sehr ähnlich. Zuerst erfolgt die Markierung des Ortes der Polarisierung in Abhängigkeit vom Zellzyklus oder externen Reizen, wie z.B. bei der Zellpaarung. Anschließend wird die Polarität durch die Rekrutierung und Aktivierung der Faktoren etabliert, die das Zytoskelett asymmetrisch reorganisieren. In der Folge kommt es zur polarisierten Sekretion, was letztendlich zum polaren Wachstum führt (Perez and Rincón, 2010). Dabei weisen beide Organismen jedoch grundsätzlich unterschiedliche Mechanismen der Zellvermehrung auf. *S. cerevisiae* vermehrt sich durch Knospung. Die runden Zellen bilden eine Knospe, die während der frühen G1 Phase durch apikales Wachstum bis zu einer kritischen Größe heranwächst. Anschließend vergrößert sich die Knospe durch isotropes Wachstum und rundet sich ab. Nach der Mitose werden Tochter und Mutterzelle durch Einzug des Septums voneinander getrennt (Perez and Rincón, 2010). *S. pombe* Zellen haben eine längliche zylindrische Form und vermehren sich durch zentrale Spaltung. Während der G1 Phase findet zunächst monopolares apikales Wachstum am sogenannten alten Ende statt. Zu Beginn der G2 Phase wird das Wachstum am neuen Ende induziert (NETO: new end take off) und die Zelle wächst bipolar. Nach der Mitose wird ein zentrales Septum gebildet, mit dessen Hilfe sich die Zellen trennen (Perez and Rincón, 2010).

Die Regulation von Cdc42 in *S. cerevisiae* und seine Effektoren

In *S. cerevisiae* wird die zukünftige Knospungsstelle durch die Ras-ähnliche GTPase Bud1/Rsr1 zusammen mit ihrem GEF, Bud5, und ihrem GAP, Bud2, markiert (Chant et al., 1995; Chant and Pringle, 1995; Park and Bi, 2007). Rsr1 rekrutiert Cdc24, den einzigen und essentiellen GEF für Cdc42 in der Bäckerhefe, an die Knospungsstelle (Gulli and Peter, 2001; Park and Bi, 2007) (Abb. 1.8 A). Die Aktivität von Cdc24 wird genau reguliert. So wurde beschrieben, dass der GEF während der frühen G1 Phase durch die Interaktion mit Far1 im Zellkern zurückgehalten wird, um eine unkontrol-

1 Einleitung

lierte Aktivierung von Cdc42 zu verhindern. Die Freisetzung von Cdc24 aus dem Kern erfolgt in Abhängigkeit von der Phosphorylierung des Far1 Proteins durch das G1 Cyclin Cdc28 (Nern and Arkowitz, 2000; Shimada et al., 2000; Toenjes et al., 1999). Es wurde auch eine direkte Phosphorylierung von Cdc24 durch Cdc28 beschrieben (Cole et al., 2009; Wai et al., 2009). In einer weiteren Studie wurden Auswirkungen dieser Phosphorylierung auf die Lokalisation von Cdc24 festgestellt (Cole et al., 2009), wogegen in einer anderen Veröffentlichung eine Cdc24 Variante beschrieben wurde, die trotz Fehlen aller beobachteten CDK Phosphorylierungsstellen keine sichtbaren Defekte aufwies (Wai et al., 2009). Eine weitere Regulierung von Cdc24 erfolgt zudem durch Oligomerisierung des GEFs, die ihn im inaktiven Zustand hält (Mionnet et al., 2008). Die Rekrutierung von Cdc24 durch die Interaktion mit Rsr1 führt zu einer lokalen Aktivierung und Anreicherung von Cdc42 an der Knospenstelle. Diese führt zur Polarisierung des Aktinzytoskeletts und zur zielgerichteten Sekretion (Park and Bi, 2007). Cdc24 und Cdc42-GTP können, wie auch viele der bekannten Cdc42 Effektoren, mit dem Gerüstprotein Bem1 interagieren (Gulli and Peter, 2001; Irazoqui et al., 2003; Kozubowski et al., 2008) (Abb. 1.8 A). Es konnte gezeigt werden, dass die Hefezellen auch in Abwesenheit von Rsr1 mit Hilfe von Bem1 polarisieren können (Irazoqui et al., 2003). Allerdings wurde das Gerüstprotein durch die Expression einer direkten Fusion von Cdc24 mit dem Cdc42 Effektor Cla4 für den Prozess der Zellpolarisation überflüssig. Daher wurde postuliert, dass die Hauptfunktion von Bem1 darin liegt, GEF und Effektor zusammenzubringen (Kozubowski et al., 2008).

Cla4 und die nah verwandte Kinase Ste20 gehören zu den p21-aktivierten Kinasen (PAKs) und agieren beide als Effektoren von Cdc42 (Abb. 1.8 B). Cdc42 interagiert

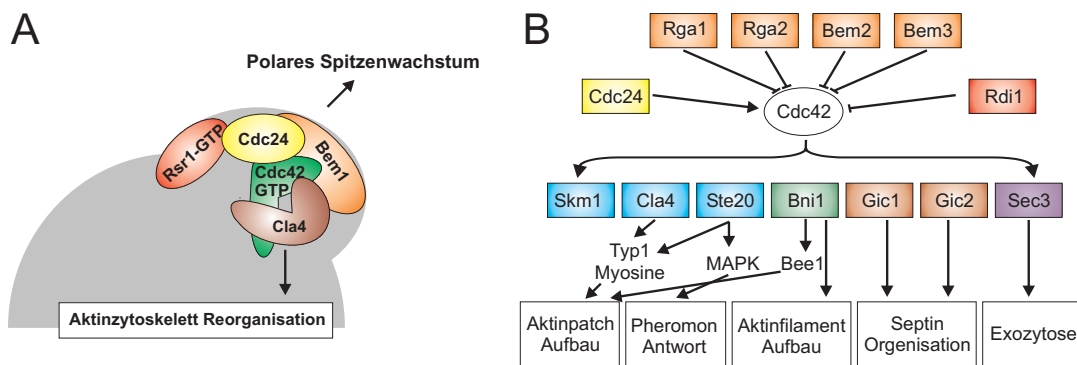


Abbildung 1.8: Regulatorische Proteine und Effektoren von Cdc42 in *S. cerevisiae*. A) Schematische Darstellung des Signalmoduls, das die Zellpolarität von *S. cerevisiae* reguliert. Rsr1-GTP rekrutiert und aktiviert den GEF Cdc24, was zur Aktivierung von Cdc42 führt. Cdc24, Cdc42-GTP und der Effektor Cla4 interagieren mit dem Gerüstprotein Bem1. B) Übersicht über die Regulatoren und Effektoren von Cdc42 in *S. cerevisiae*. GEF: gelb, GAP: orange, GDI: rot, PAK: blau, Formin: grün, CRIB-Protein: braun, Exozyt: violett. Modifiziert nach (Perez and Rincón, 2010).

1 Einleitung

dabei mit der sogenannten Cdc42/Rac1 interaktiven Bindungs-Domäne (CRIB) von Ste20 und Cla4. Dies führt zur Aufhebung einer intramolekularen Inhibitionsstruktur, wodurch die C-terminale Kinasedomäne aktiv wird (Lamson et al., 2002). Aktives Cla4 phosphoryliert Cdc24 (Gulli et al., 2000). Ob diese beobachtete Cla4-abhängige Phosphorylierung von Cdc24 eine biologische Funktion hat, ist jedoch unklar. Es wurde postuliert, dass diese Modifikation die Aktivität des GEFs stimuliert und damit zu einer Verstärkung der Cdc42 Aktivierung führt (Irazoqui et al., 2003; Kozubowski et al., 2008). Ein anderes Modell geht davon aus, dass die Phosphorylierung des GEFs zur Dissoziation von Cdc24 und Bem1 führt und dass diese negative Rückkopplungs-Regulation dem Wechsel vom apikalen zum isotropen Wachstum dient (Bose et al., 2001). Alle diese Theorien wurden jedoch durch die Beobachtung in Frage gestellt, dass ein Stamm, der eine Variante von Cdc24 exprimiert, in der alle durch Massenspektrometrie identifizierten Phosphorylierungsstellen mutiert sind, keine offensichtlichen Defekte aufweist (Wai et al., 2009).

Cla4 und Ste20 regulieren das Aktinzytoskelett vermutlich über die Phosphorylierung und Aktivierung der Typ1 Myosine Myo3 und Myo5, die als Aktivatoren des Aktin polymerisierenden Arp2/3 (actin-related protein 2/3) Komplexes bekannt sind (Lechler et al., 2001; Wu et al., 1996a, 1997) (Abb. 1.8 B). Das Formin Bni1, das die Bildung von Aktinfilamenten stimuliert, kann neben Rho1 und Rho3 auch mit Cdc42 interagieren (Dong et al., 2003). Durch Cdc42 wird Bni1 an die Knospenspitze rekrutiert, von der aus es die Aktinpolymerisation auslöst und einen weiteren Aktivator des Arp2/3 Komplexes, Bee1, rekrutiert (Buttery et al., 2007; Dong et al., 2003; Lechler et al., 2001) (Abb. 1.8 B). Als weitere Interaktionspartner von Cdc42 konnten in der Bäckerhefe die CRIB-enthaltenden Proteine Gic1 und Gic2 identifiziert werden, die an der Rekrutierung von Septinen an die Knospungsstelle beteiligt sind (Brown et al., 1997; Iwase et al., 2006). Auch konnte eine Interaktion von Cdc42 mit einer Untereinheit des Exozyst Komplexes, Sec3, gezeigt werden (Zhang et al., 2001) (Abb. 1.8 B).

In *S. cerevisiae* wird die GTPase Aktivität von Cdc42 durch vier GAPs, Rga1, Rga2, Bem2 und Bem3 reguliert (Abb. 1.8 B). Einzeldelationen der GAPs sind lebensfähig und zeigen keine gravierenden morphologischen Defekte (Zheng et al., 1994; Wang and Bretscher, 1995; Smith et al., 2002). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass *bem3/rga1* Doppelmutanten einen Defekt in der Knospenmorphologie aufweisen, was für eine überlappende Funktion der GAPs spricht (Smith et al., 2002; Caviston et al., 2003). Für Rga1 wurde zudem beschrieben, dass der GAP eine „Zone der Inhibition“ von Cdc42 an der alten Zellteilungsstelle konstituiert, die eine erneute Knospung an der Stelle verhindert (Tong et al., 2007). Bem2 und Bem3 akkumulieren an Orten, wo polares Wachstum stattfindet, und ihre Aktivität wird zellzyklusabhängig durch Cdc28-abhängige Phosphorylierung negativ reguliert (Knaus et al., 2007).

Die Lokalisation von Cdc42, Cdc24 und Bem1 ist in *S. cerevisiae* sehr dynamisch (Wedlich-Söldner et al., 2004). Cdc42 weist eine zügige Diffusionsrate in der Membran auf ($0.036 \mu\text{m}^2/\text{s}$) (Marco et al., 2007) und die Zelle braucht deshalb effiziente Mechanismen, um eine stabile Kappe von aktivem Cdc42 an Stellen polarisierten Wachstums aufrechtzuerhalten. Dafür wurden zwei Wege beschrieben (Slaughter et al., 2009). Der GDI Rdi1 konstituiert den ersten, diffusionskontrollierten, schnellen Weg. Der zweite, langsamere Weg, geschieht durch Endozytose und anschließende Sekretion (Slaughter et al., 2009).

Regulatoren und Effektoren von Cdc42 in *S. pombe*

In *S. pombe* ist im Gegensatz zu *S. cerevisiae* das Mikrotubuli (MT) Zytoskelett für die Polarität der Zellen sehr wichtig (Castagnetti et al., 2007; Martin, 2009). Die polaritätsetablierenden Proteine Tea1, Tea3 und Tea4 aggregieren an Stellen, wo die MTs in Kontakt mit dem Zellkortex stehen, was vermutlich den Ort des polaren Wachstums bestimmt (Terenna et al., 2008; Minc et al., 2009). Daher führt der Verlust von Tea1 zu rein monopolar wachsenden Zellen (Mata and Nurse, 1997). Tea3 und Tea4 haben eine Funktion bei dem MT abhängigen Transport von Tea1 zu den Plus-Enden der MTs, wo es durch Interaktion mit dem membranassoziierten Protein Mod5 verankert wird (Snaith et al., 2005; Snaith and Sawin, 2003) (Abb. 1.9 A). Tea4 vermittelt zudem die Interaktion von Tea1 und dem Formin For3 (Feierbach and Chang, 2001; Martin et al., 2005). Die Polarisierung des Aktinzytoskeletts ist abhängig von Cdc42-GTP, Bud6 und For3 (Glynn et al., 2001; Martin et al., 2007). For3 interagiert dabei mit sei-

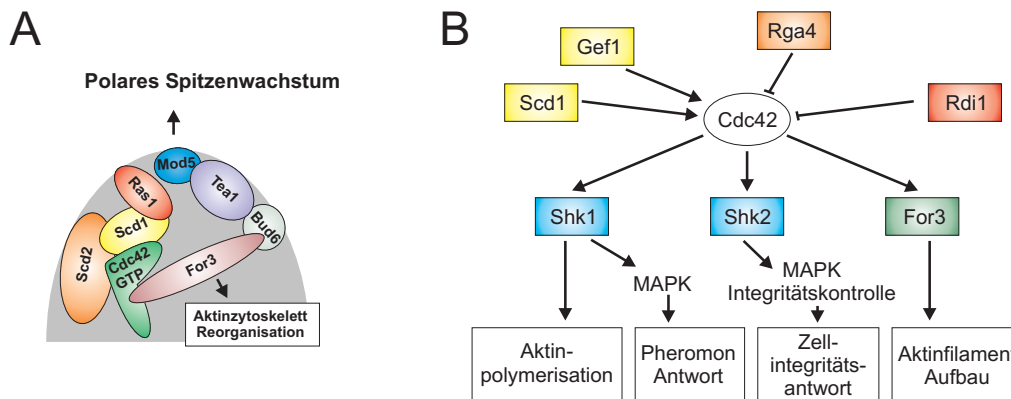


Abbildung 1.9: Regulatorische Proteine und Effektoren von Cdc42 in *S. pombe*. A) Schematische Darstellung des Signalmoduls, das die Zellpolarität von *S. pombe* reguliert. Tea1 wird durch Interaktion mit Mod5 an der Zellspitze verankert und rekrutiert For3. For3 interagiert mit Bud6 und Cdc42-GTP. Cdc42 wird durch Scd1 aktiviert. Scd2 fungiert als Gerüstprotein für Scd1 und Cdc42. B) Übersicht über die Regulatoren und Effektoren von Cdc42 in *S. pombe*. GEF: gelb, GAP: orange, GDI: rot, PAK: blau, Formin: grün. Modifiziert nach (Perez and Rincón, 2010).

nem C-Terminus mit Bud6, wodurch es an der Zellspitze verankert wird (Glynn et al., 2001; Martin et al., 2007) (Abb. 1.9 A). Durch Interaktion mit aktivem Cdc42-GTP wird die Autoinhibition von For3 aufgelöst (Martin et al., 2007). Cdc42 lokalisiert in *S. pombe* an den wachsenden Enden, wo es die Sekretion von neuem Zellwandmaterial sicherstellt, am Ort der Zellteilung und an Endomembranen (Merla and Johnson, 2000). Interessanterweise enthält die Spalthefe zwei GEFs, die für die Aktivierung von Cdc42 zuständig sind. Das Cdc24 Homolog Scd1 und einen *S. pombe* spezifischen Gef1 (Chang et al., 1994; Coll et al., 2003; Hirota et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass Scd1 durch direkte Interaktion mit Ras1 aktiviert wird (Chang et al., 1994). Die Interaktion von Ras1, Scd1 und Cdc42 wird in *S. pombe* durch das Homolog von Bem1, Scd2, vermittelt (Chang et al., 1994) (Abb. 1.9 A). Scd2 rekrutiert zudem das essentielle Ste20 Homolog Shk1, das ein Effektor von Cdc42 ist und Tea1 phosphoryliert (Endo et al., 2003; Kim et al., 2003) (Abb. 1.9 B). Ein weiterer Cdc42 Effektor ist die nichtessentielle PAK Shk2, die mit der MAPKKK (mitogen-activated protein kinase kinase) interagiert, bei deren Aktivierung aber nur eine sekundäre Rolle spielt (Madrid et al., 2006; Merla and Johnson, 2001) (Abb. 1.9 B). Der zweite Cdc42 GEF, Gef1, hat eine Rolle beim Umschalten vom monopolen auf das bipolare Wachstum und bei der Regulation der Zellteilung (Coll et al., 2003; Hirota et al., 2003). In *S. pombe* ist nur ein einziger GAP für Cdc42 beschrieben, Rga4 (Tatebe et al., 2008). Rga4 lokalisiert an den Zellflanken und in der Teilungszone und ist ein Interaktor der Kinase Pom1, die für die Positionierung des Aktin-Myosinrings und für den Wechsel vom monopolen zum bipolaren Wachstum notwendig ist (Das et al., 2007; Tatebe et al., 2008).

1.2.6 Cdc42 und Rac1 in *Ustilago maydis*

In *U. maydis* sind Rac1 und Cdc42 nicht essentiell. Deletionsmutanten von *cdc42* haben eine normale Zellform und sind in der Lage zu knospen, weisen jedoch einen Zellseparierungsdefekt auf (Mahlert et al., 2006) (Abb. 1.10 A). *U. maydis* Zellen vollziehen die Zellteilung nach der Knospung durch das Einziehen eines primären und eines sekundären Septums, die eine vakuolierte Fragmentierungszone umschließen (O'Donnel and McLaughlin, 1984). Dabei ist die Ausbildung des sekundären Septums strikt von der Anwesenheit von Cdc42 abhängig (Mahlert et al., 2006). Eine weitere wichtige Funktion nimmt Cdc42 bei dem Einzug der distalen Septen im Filament wahr (Mahlert et al., 2006; Freitag et al., 2011). Rac1 hat eine zentrale regulatorische Funktion für das polare Wachstum in *U. maydis*. Deletionsmutanten von *rac1* sind weder in der Lage zu knospen (Abb. 1.10 A), noch können sie Paarungshyphen oder Filamente ausbilden (Mahlert et al., 2006). $\Delta rac1$ Zellen vermehren sich durch Spaltung mit Hilfe eines einzelnen Septums in der Mitte der Zelle (Abb. 1.10 A). Die Depletion von Rac1 führt

1 Einleitung

im *cdc42* Deletionshintergrund zum Zelltod (Mahlert et al., 2006). Die Zellen arretieren als multiseptierte Ketten (Abb. 1.10 A).

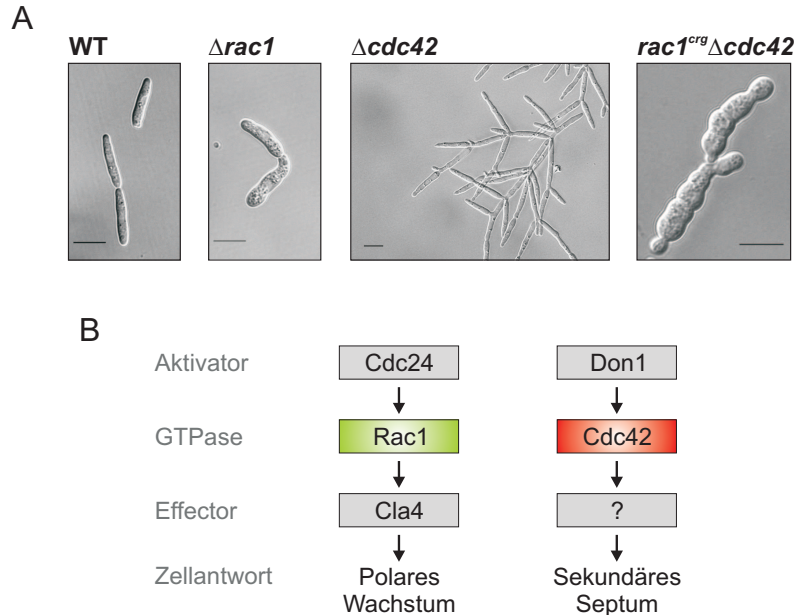


Abbildung 1.10: Rac1 reguliert in *U. maydis* das polare Wachstum und Cdc42 die Bildung des sekundären Septums. A) Phänotyp von *rac1*, *cdc42* und *rac1/cdc42* Mutanten. Die Einfachmutanten wurden durch Deletion erzeugt, die Doppelmutante durch Deletion von *cdc42* in einer konditionalen Mutante von *rac1*, die das *rac1* Gen unter der Kontrolle des induzierbaren *crg* Promotors exprimiert. Die Doppelmutante wurde unter repressiven Bedingungen angezogen. Der Größenstandard repräsentiert 10 μm . **B)** Schematische Darstellung der Rac1 und Cdc42 abhängigen Signalmodule in *U. maydis*.

Die PAK Kinasen Cla4, Skm1 und das Ste20 Homolog Smu1 konnten in einem Hefe Zwei-Hybrid Test als Interaktoren von Cdc42 und Rac1 identifiziert werden (Leveleki et al., 2004). Ferner konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *cla4* zu einem mit der Deletion von *rac1* vergleichbaren Phänotyp führt (Leveleki et al., 2004; Mahlert et al., 2006). Auch ist Rac1 in Abwesenheit von Cla4 nicht in der Lage, dass filamentöse Wachstum zu induzieren (Mahlert et al., 2006). Das *U. maydis* Homolog des Aktinregulators WASP ist in *U. maydis* essentiell und interagiert spezifisch mit Cdc42 (Björn Sandrock, persönliche Mitteilung). Jedoch ist WASP nicht zwingend auf die Interaktion mit Cdc42 angewiesen, da es in dessen Abwesenheit und ebenso bei Unterbindung der Interaktion mit Cdc42, funktionsfähig zu sein scheint (Björn Sandrock, persönliche Mitteilung). Ein weiterer spezifischer Interaktor von Cdc42 ist das Formin Drf1, das als Effektor von Cdc42 bei der Ausbildung der distalen Septen im Filament wirkt (Freitag et al., 2011).

1 Einleitung

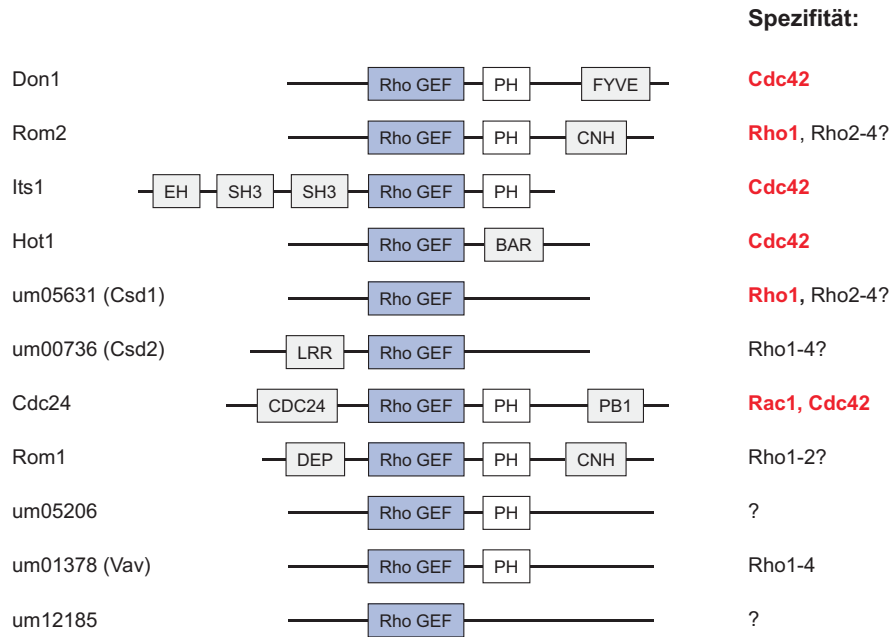


Abbildung 1.11: Rho-GEFs in *U. maydis* In einer genomweiten Analyse konnten elf potentielle Rho-GEFs der Dbl-Familie identifiziert werden. Alle elf Proteine weisen die charakteristische Rho-GEF Domäne auf und, bis auf vier Ausnahmen, auch eine benachbarte Pleckstrin Homologie (PH) Domäne. Die Proteine wurden basierend auf Sequenzähnlichkeiten in ihren katalytischen Domänen zu bereits charakterisierten GEFs aus anderen Organismen (Rom2, Its1, Hot1, Cdc24, Rom1), oder aufgrund ihrer Funktionen (Don1: Doughnut shaped colonies, Csd1/2: Cell separation defect) benannt. Durch einen *in vitro* GEF-assay überprüfte GTPase-Spezifitäten sind rot gedruckt und die aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zu anderen GEFs vermuteten in schwarz. FYVE: Fab1/YOTB/Vac1/EEA1 homologe lipidbindende Domäne, CNH: Citron Kinase homologe Domäne, EH: Eps15 homologe Domäne, SH3: Src homologe Domäne, BAR: Bin amphiphysin rvs 161/167 homologe Domäne, LRR: Leucin reiche Sequenzwiederholung, Cdc24: Calponin homologe Domäne, PB1: Phox und Bem1 homologe Domäne, DEP: Discheveled/EGL-10/Pleckstrin homologe Domäne. Modifiziert nach (García-Pedrajas et al., 2008).

In *U. maydis* konnten durch eine genomweite Analyse 11 potentielle Rho-GEFs der Dbl-Familie identifiziert werden (García-Pedrajas et al., 2008) (Abb. 1.11). Der am besten charakterisierte Rho-GEF ist dabei der mit dem GEF FGD1 aus höheren Eukaryoten verwandte GEF Don1 (Hlubek et al., 2008; Schink and Bölker, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass Don1 Cdc42 selektiv während der Zellteilung aktiviert und so die Ausbildung des sekundären Septums stimuliert (Hlubek et al., 2008; Schink and Bölker, 2009) (Abb. 1.10 B). Im Rahmen vorangegangener Arbeiten ist es gelungen, zwei weitere Cdc42-spezifische GEFs zu identifizieren (Andrea Hlubek, Dissertation; Florian Rosenthal, Diplomarbeit; Britta Tillmann, Diplomarbeit). Hot1, das *U. maydis* Homolog des GEFs TUBA aus Säugern, aktiviert spezifisch Cdc42. Der ungewöhnliche GEF enthält anstatt einer PH-Domäne eine BAR-Domäne in unmittelbarer Nachbarschaft zur DH-Domäne, die durch Homo- oder Heterodimerisierung mit einer weiteren BAR-Domäne Membrankrümmungen erkennen kann (Abb. 1.11).

1 Einleitung

Hot1 hat keine wichtige Funktion während des vegetativen Wachstums, seine Deletion führt jedoch zu einer reduzierten Virulenz von *U. maydis* (Britta Tillmann, Diplomarbeit). Eine weitere Cdc42-spezifische DH-Domäne findet sich in der langen Variante des Endozytose-Gerüstproteins Intersectin (Andrea Hlubek, Dissertation; Florian Rosenthal, Diplomarbeit) (Abb. 1.11). Intersectin wird in *U. maydis*, wie auch sein Homolog in Säugern (Guipponi et al., 1998), differentiell gespleißt, was zu einer kurzen Variante führt, die den GEF nicht enthält und einer den GEF enthaltenden, langen Variante. Die Expression einer erzwungen kurzen oder erzwungen langen Variante hat während des vegetativen Wachstums von *U. maydis* keine Auswirkung. Jedoch ist die Virulenz von Stämmen reduziert, die ausschließlich die kurze Variante exprimieren (Florian Rosenthal, Diplomarbeit). Für Rac1 konnte bis jetzt nur eine Aktivierung durch die katalytische Domäne des Cdc24 Homologs von *U. maydis* *in vitro* nachgewiesen werden (Kay Schink, Dissertation; Andrea Hlubek, Dissertation). Die Tatsache, dass die Überexpression dieses essentiellen GEFs in einer Filamentinduktion resultiert, führte zu der Vermutung, dass es sich dabei um den GEF für Rac1 während des polaren Wachstums handelt (Castillo-Lluva et al., 2007) (Abb. 1.10 B).

Des weiteren konnten bislang zehn potentielle Rho-GAPs in einer genomweiten Analyse identifiziert werden, die aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten zu bereits charakterisier-

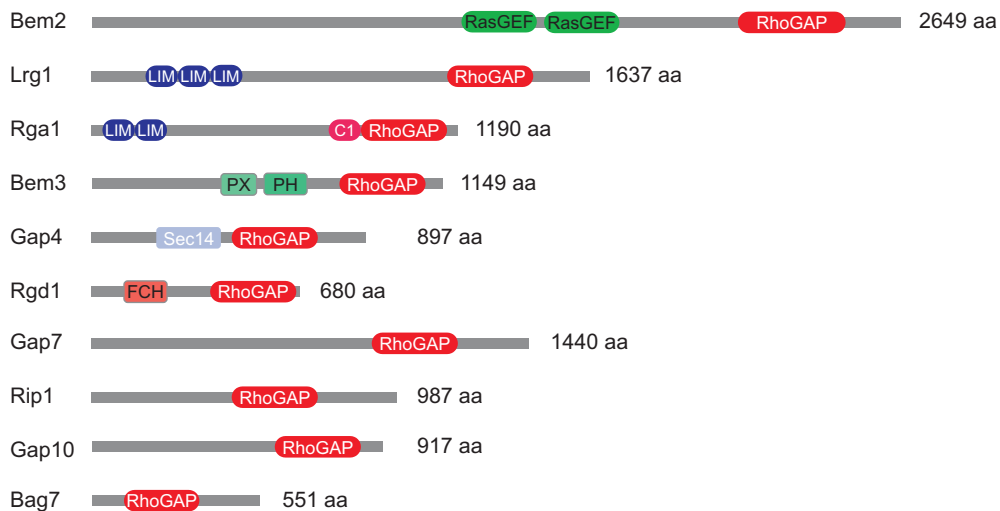


Abbildung 1.12: Rho-GAPs in *U. maydis*. In einer genomweiten Analyse konnten zehn potentielle Rho-GAPs identifiziert werden, die aufgrund von Ähnlichkeiten in Sequenz und Aufbau zu Proteinen in anderen Organismen benannt wurden (Bem2, Lrg1, Rga1, Bem2, Rgd1, Bag7). Vier GAPs weisen keinerlei Ähnlichkeiten zu bereits beschriebenen Proteinen aus anderen Organismen auf (Gap4, Gap7, Rip1, Gap10). RasGEF: Ras Guanin Nukleotid Austausch Domäne, LIM: Cystein und Histidin reiche Lin1/Isl1/Mec3 homologe Domäne, PX: P40 phox homologe phosphoinositidbindende Domäne, PH: Pleckstrin homologe lipidbindende Domäne, Sec14: Sec14 homologe lipidbindende Domäne, FCH: FER/Cip4 homologe Domäne. (Die Abbildung wurde von Björn Sandrock zur Verfügung gestellt)

ten GAPs aus anderen Organismen benannt wurden (Abb. 1.12). Unter ihnen finden sich auch Homologe der Cdc42-GAPs Bem2, Rga1 und Bem3 aus *S. cerevisiae*. Zudem gibt es vier *U. maydis* spezifische GAPs (Rip1, Gap4, GAP7, GAP10), die keine Homologien zu bereits charakterisierten Proteinen aus anderen Organismen aufweisen. Die funktionelle Charakterisierung der GAPs steht erst am Anfang. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei keinem dieser Regulatoren um ein essentielles Protein handelt (Björn Sandrock, persönliche Mitteilung). Zudem haben die GAPs offenbar weitestgehend überlappende Funktionen, da ihre Einzeldelationen, wenn überhaupt, nur sehr schwache morphologische Defekte aufweisen. Durch Kopräzipitationsexperimente ist es gelungen, Interaktionen zwischen den GAP-Domänen von Bem3, GAP4 und GAP7 mit Cdc42 nachzuweisen (Björn Sandrock, persönliche Mitteilung; Sandra Przybilla, Bachelorarbeit). Welche GAPs *in vivo* die GTPase Aktivität von Rac1 stimulieren ist bislang noch unklar.

In *U. maydis* konnte auch ein mit dem Rho-GDI Rdi1 verwandtes Protein identifiziert werden (Andrea Hlubek, Dissertation). Die Deletion von *rdi1* hat in *U. maydis* keine starken morphologischen Auswirkungen (Andrea Hlubek, Dissertation). Ob Rdi1 tatsächlich als GDI für Rac1, Cdc42, oder beide fungiert, konnte experimentell noch nicht gezeigt werden.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die kleine GTPase Rac1 ist einer der zentralen Regulatoren der Zellpolarität in höheren Eukaryoten (Burridge and Wennerberg, 2004). Ein detailliertes Verständnis für das feinabgestimmte Zusammenspiel aller die Rac1 Aktivität regulierenden Proteine zu gewinnen, ist aufgrund der Komplexität der Signalnetzwerke in höheren Eukaryoten (22 Rho-GTPases, 60 GEFs, 70 GAPs) kaum möglich. In dem wesentlich übersichtlicheren Modellsystem *U. maydis* (6 Rho-GTPasen, 11 GEFs, 10 GAPs), ist Rac1 für das polare Wachstum während der Knospung und Filamentbildung unverzichtbar (Mahlert et al., 2006). Aus diesem Grund sollte *U. maydis* im Rahmen dieser Arbeit genutzt werden, um das Zusammenspiel von GEFs, GAPs, Effektoren und GDI bei der Regulation der Rac1-Aktivität während des polaren Wachstums zu analysieren.

Dabei lag der Schwerpunkt zunächst auf der Identifikation aller Komponenten des Rac1 Signalnetzwerks, zusätzlich zu dem bereits bekannten Effektor, der PAK Kinase Cla4 (Mahlert et al., 2006). Der essentielle Dbp-ähnliche GEF Cdc24 fungiert *in vitro* als Aktivator von UmRac1 (Andrea Hlubek, Dissertation; Kay Schink, Dissertation), daher war der Nachweis der *in vivo* Aktivierung von Rac1 durch diesen GEF ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit. Aufgrund der Tatsache, dass Bem1p als Gerüstprotein für das polare Wachstum in *S. cerevisiae* fungiert (Gulli and Peter, 2001; Irazoqui et al.,

1 Einleitung

2003; Kozubowski et al., 2008), sollte das verwandte Protein Bem1 in *U. maydis* in die Analyse miteinbezogen werden. Über eine Beteiligung des Rho-GDIs Rdi1 an der Regulation von Rac1 während des polaren Wachstums von *U. maydis*, bestanden zu Beginn dieser Arbeit keine Erkenntnisse. Ebenfalls waren noch keine Rac1-GAPs in *U. maydis* bekannt. Aus diesem Grund war die Aufklärung der regulatorischen Interaktionen mit GAPs und dem GDI Rdi1 ein weiteres Ziel.

Neben der Identifikation der Rac1 Regulatoren, war ihr Zusammenspiel während des polaren Wachstums ein besonderer Schwerpunkt dieser Arbeit. Im Zentrum stand dabei die Fragestellung, wie es während des polaren Wachstums zur lokalen Konzentration der Rac1-Aktivität an der Hyphenspitze kommt.

Ein weiterer Focus dieser Arbeit lag darauf zu untersuchen, wie die Verantwortlichkeit der GTPase Rac1 für das polare Wachstum zustande kommt und welche Komponenten des Signalmoduls dafür verantwortlich sind, dass Rac1 und nicht die nah verwandte GTPase Cdc42 die Zellpolarität reguliert.

2 Ergebnisse

2.1 Die Aktivität des Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1 Signalmoduls wird während des polaren Wachstums von *Ustilago maydis* durch eine negative Rückkopplungsschleife reguliert

2.1.1 Ein Signalmodul aus Cdc24, Rac1, Cla4 und Bem1 reguliert das polare Wachstum in *U. maydis*

Die morphologische Transition von der Knospung zum filamentösen Wachstum ist in *U. maydis* von der kleinen GTPase Rac1 und ihrem Effektor, der PAK-ähnlichen Kinase Cla4 abhängig (Leveleki et al., 2004; Mahlert et al., 2006). Die Überexpression von Rac1 ist ausreichend, um in haploiden Zellen filamentöses Wachstum zu induzieren (Mahlert et al., 2006) (Abb. 2.1 A). Interessanterweise resultierte die Überexpression von Cla4 nicht in einer Filamentinduktion (Abb. 2.1 A). Dies kann entweder daher rühren, dass die Menge an Cla4 kein limitierender Faktor ist, oder dass die Überexpression von Cla4 nicht zu einem erhöhten Niveau an aktiver Kinase führt. Die zweite Hypothese kann als richtig angesehen werden, da bereits die schwache Überexpression von konstitutiv aktivem Cla4 Δ CRIB in der Lage war, filamentöses Wachstum zu induzieren (siehe Abb. 2.1 A). Auch die Überexpression des Dbl-Familien Guaninnukleotid Austauschfaktors (GEFs) Cdc24 resultierte in der Ausbildung von Filamenten (Abb. 2.1 A). Um die epistatischen Beziehungen von Cdc24, Rac1 und Cla4 zu untersuchen, wurde der potentielle Rac1-GEF Cdc24 in Deletionsmutanten von *rac1* und *cla4* überexprimiert. Die Filamentinduktion wurde durch Auftropfen auf aktivkohlehaltiges Festmedium getestet, wo sie zu einer weißen, pelzigen Kolonieoberfläche führt. Die Überexpression von Cdc24 induzierte weder in Δ *rac1*, noch in Δ *cla4* Mutanten filamentöses Wachstum (Abb. 2.1 B), was darauf hindeutet, dass Cdc24 in einer Signalkaskade oberhalb von Rac1 und Cla4 agiert (siehe Abb. 2.1 C).

Die Überexpression des *U. maydis* Homologs des Gerüstproteins Bem1, das in *S. cerevisiae* als Interaktionsplattform für das Cdc24/Cdc42/Cla4 Signalmodul fungiert (Peterson et al., 1994; Bose et al., 2001), führte ebenfalls zum filamentösen Wachstum (Abb. 2.1 A). Auch das durch Bem1 induzierte Filament war von Rac1 und Cla4 ab-

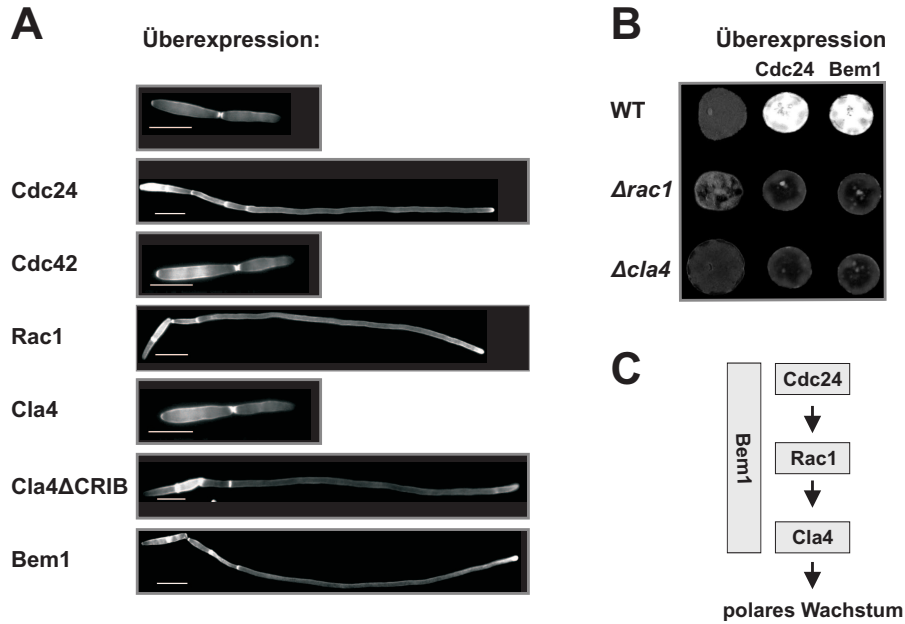


Abbildung 2.1: Eine durch Bem1 koordinierte lineare Signalkaskade reguliert die Zellpolarität in *U. maydis*. **A)** Phänotyp von Zellen, die Cdc24, Cdc42, Rac1, Cla4, Cla4ΔCRIB oder Bem1 überexprimieren. Die Zellen wurden in Flüssigmedium unter induzierenden Bedingungen angezogen. Die Zellwände wurden mit „Calcofluor-Weiss“ angefärbt. Knospende Zellen weisen ein charakteristisches Doppelseptum zwischen Mutter- und Tochterzelle auf. Filamentöse Zellen zeigen Retraktionssepten am distalen Ende. Der Größenstandard repräsentiert 10 μ m. **B)** Epistasise Analyse von *cdc24*, *bem1*, *rac1* und *cla4*. Wildtyp, $\Delta rac1$ und $\Delta cla4$ Zellen, die entweder Cdc24 oder Bem1 überexprimierten, wurden auf induzierendes aktivkohlehaltiges Festmedium aufgetropft. Filamentbildung wird durch das weiße Luftmycel an der Kolonieoberfläche angezeigt. **C)** Schematische Übersicht über die Signalkaskade, die die Zellpolarität in *U. maydis* kontrolliert. Bem1 agiert dabei als Gerüstprotein, das die Interaktionen zwischen GEF, GTPase und Effektor vermittelt.

hängig (Abb. 2.1 B). Es war leider nicht möglich, die Funktion von Bem1 während des durch die Überexpression von Cdc24 oder Rac1 induzierten filamentösen Wachstums zu untersuchen, da eine konditionale Mutante, die *bem1* unter der Kontrolle des durch Arabinose induzierbaren *crg* Promotors exprimierte, unter repressiven Bedingungen nicht lebensfähig war. Nach Depletion arretieren die *bem1* Mutanten als kleine Zellen mit stark reduzierter Polarität (nicht gezeigt).

Da die Epistasiseanalyse darauf hindeutete, dass in *U. maydis* eine durch Bem1 vermittelte Signalkaskade von Cdc24, Rac1 und Cla4 das polare Wachstum reguliert, wurde die Lokalisation der Komponenten überprüft. Um die Lokalisationen von Cdc24 und Cla4 zu untersuchen, wurden funktionelle C-terminale GFP-Fusionen hergestellt und ektopisch in *cdc24*, bzw. *cla4* Mutanten konstitutiv exprimiert. Im Falle von Bem1 war nur die N-terminale Fusion funktionell und in der Lage, eine Bem1 Depletion zu komplementieren. Cdc24-GFP, GFP-Bem1 und Cla4-GFP akkumulierten sowohl an der Knospenspitze, als auch an der Spitze von induzierten Filamenten (Abb. 2.2 A). Diese

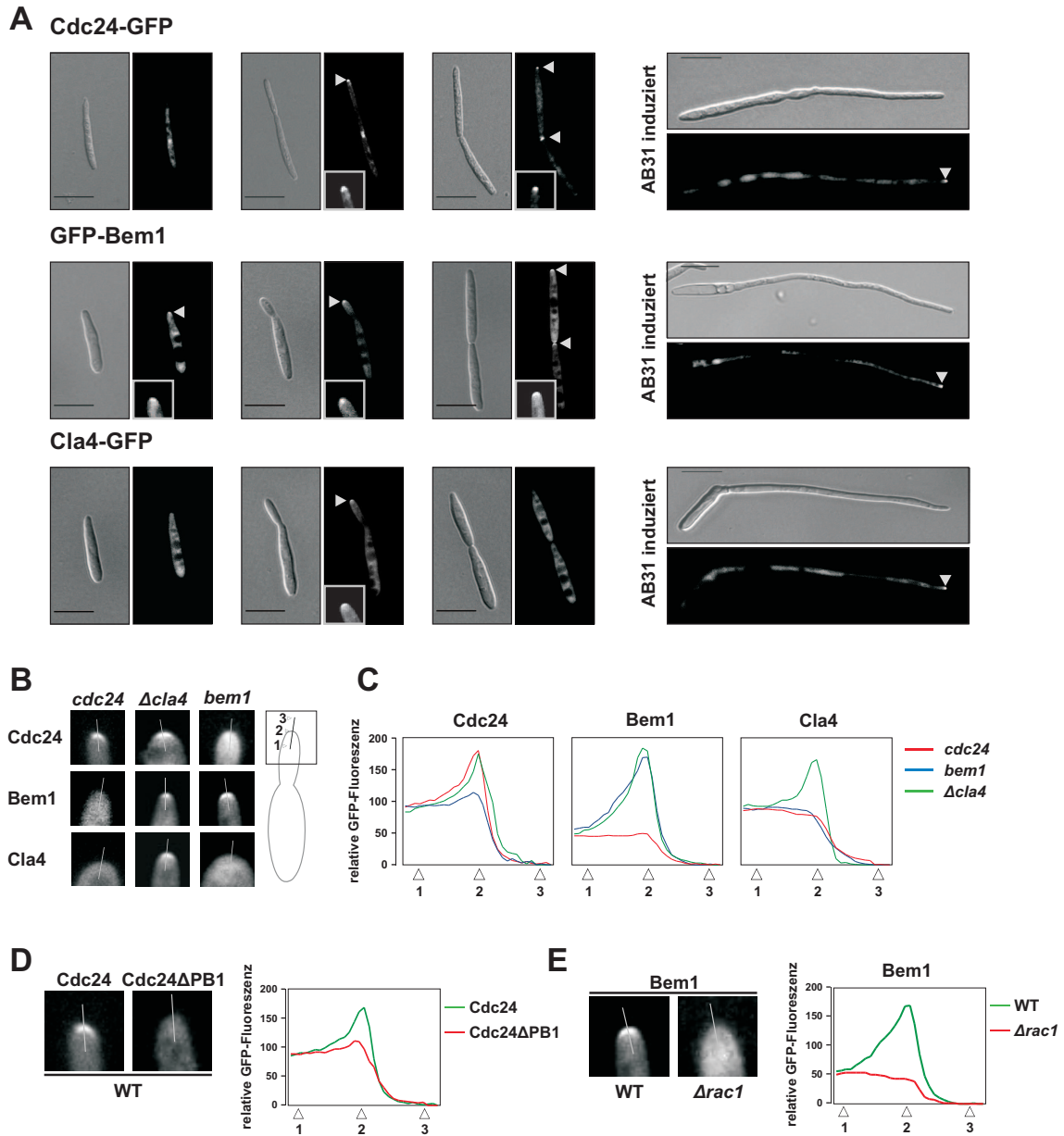


Abbildung 2.2: Cdc24, Bem1 und Cla4 lokalisieren in kooperativer Weise an der polar wachsenden Spitze. A) Lokalisation der GFP-Fusionen von Cdc24, Bem1 und Cla4 in knospenden Zellen und in Filamenten, die durch die Überexpression des heterodimeren bW2/bE1 Transkriptionsfaktors induziert wurden. Der Größenstandard repräsentiert 10 μm . Die Insertionen zeigen die Knospenspitzen in stärkerer Vergrößerung. **B)** Repräsentative Akkumulationen von Cdc24-GFP, GFP-Bem1 und Cla4-GFP an den Zellspitzen von *cdc24*, *cla4* und *bem1* Mutanten. **C)** Die GFP-Fluoreszenz wurde in den in (B) gezeigten Zellen entlang einer longitudinalen Achse, die die Zellspitze durchschneidet, gemessen. Die Intensitätsdiagramme resultieren aus den Mittelwerten von 5 Messungen. Die GFP-Fluoreszenz ist in relativen Einheiten angegeben. Die Pfeilspitzen zeigen die Position entlang der Achse an. **D)** Vergleich der Lokalisation von Cdc24-GFP und Cdc24 Δ PB1-GFP an der Knospenspitze von wildtyp Zellen. Die GFP-Fluoreszenz wurde wie in (C) beschrieben gemessen. **E)** Lokalisation von GFP-Bem1 in wildtyp und in Δ *rac1* Zellen. Die Intensitätsdiagramme wurden wie in (C) hergestellt.

2 Ergebnisse

Spitzenlokalisation fand in kooperativer Weise statt. Bei Depletion von Bem1 war weder eine Akkumulation von Cdc24-GFP, noch eine von Cla4-GFP zu beobachten (Abb. 2.2 B und C). In Abwesenheit von Cdc24 konnte GFP-Bem1 und somit auch Cla4-GFP nicht an der Spitze lokalisieren (Abb. 2.2 B und C). In *S. cerevisiae* interagieren Cdc24 und Bem1 über ihre C-terminalen PB1-Domänen (Bose et al., 2001; Kozubowski et al., 2008) (Abb. 2.3 A). Die Spitzenakkumulation von Cdc24-GFP war von der Anwesenheit der C-terminalen PB1-Domäne abhängig (Abb. 2.2 D), woraus folgt, dass eine Interaktion mit Bem1 für die polare Lokalisation notwendig ist. In Abwesenheit von Rac1 war keine Akkumulation von GFP-Bem1 an der Zellspitze zu detektieren (Abb. 2.2 E), was darauf hindeutet, dass die Interaktion mit der GTPase für die Lokalisation des Signalmoduls eine entscheidende Rolle spielt. Vorstellbar ist, dass der Prenylanker von Rac1 benötigt wird, um eine stabile Lokalisation des Komplexes an der Membran zu gewährleisten.

Um die Komplexbildung von Cdc24, Rac1, Cla4 und Bem1 direkt zu testen, wurden Kopräzipitationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden aus *E. coli* aufgereinigte Rac1-Fusionsproteine genutzt (Abb. 2.3 C), die mit GDP oder nicht spaltbarem GTP γ S beladen und anschließend mit *U. maydis* Proteinextrakten inkubiert wurden. In einem ersten Experiment wurden Extrakte von Stämmen genutzt, die Cdc24-GFP, Cla4-GFP oder GFP-Bem1 einzeln überexprimierten. Inaktives Rac1-GDP zeigte eine hohe Affinität zu Cdc24 und keine Affinität zu Bem1 (Abb. 2.3 D). Zudem konnte eine sehr geringe, aber reproduzierbare Affinität von Rac1-GDP für Cla4 festgestellt werden (Abb. 2.3 D). Aktives Rac1-GTP γ S war nicht in der Lage, Cdc24 zu präzipitieren, hatte aber hohe Affinität zu Cla4 und Bem1 (Abb. 2.3 D). Die positive Interaktion zwischen aktivem Rac1-GTP γ S und Cla4 war dabei von der CRIB-Domäne von Cla4 abhängig (Abb. 2.3 G). Wenn dominant negatives GST-Rac1^{T17N} (Stacey et al., 1991) oder dominant aktives NusA-6xHis-Rac1^{Q61L} (Ziman et al., 1991) zur Kontrolle genutzt wurden, verhielten sie sich in ihren Affinitäten vergleichbar zu GST-Rac1-GDP, bzw. GST-Rac1-GTP γ S (Abb. 2.3 D). Im folgenden Experiment wurden alle Interaktionspartner von Rac1 in paarweisen Kombinationen getestet. In der Anwesenheit von Cdc24 war eine schwache Interaktion von Rac1-GDP und Bem1 zu detektieren. Umgekehrt führte die Anwesenheit von Bem1 zu einer Kopräzipitation von Cdc24 mit Rac1-GTP γ S, die von der C-terminalen PB1-Domäne von Cdc24 abhängig war (Abb. 2.3 E und F). Diese Daten weisen auf die Bildung eines ternären Komplexes von Cdc24, Rac1 und Bem1 hin. Die Kopräzipitation von Bem1 und Cla4 mit Rac1-GTP γ S könnte auch daher rühren, dass aktives Rac1 mit beiden Proteinen einzeln interagieren kann. Jedoch weist die Kopräzipitation von Bem1 und mutiertem Cla4 Δ CRIB, das selbst nicht mehr mit Rac1 interagieren kann, auf einen ternären Bem1/Rac1/Cla4 Komplex hin (Abb. 2.3 E und G). Die Bildung eines Cdc24/Rac1/Bem1/Cla4 Komplexes konnte durch Kopräzipitati-

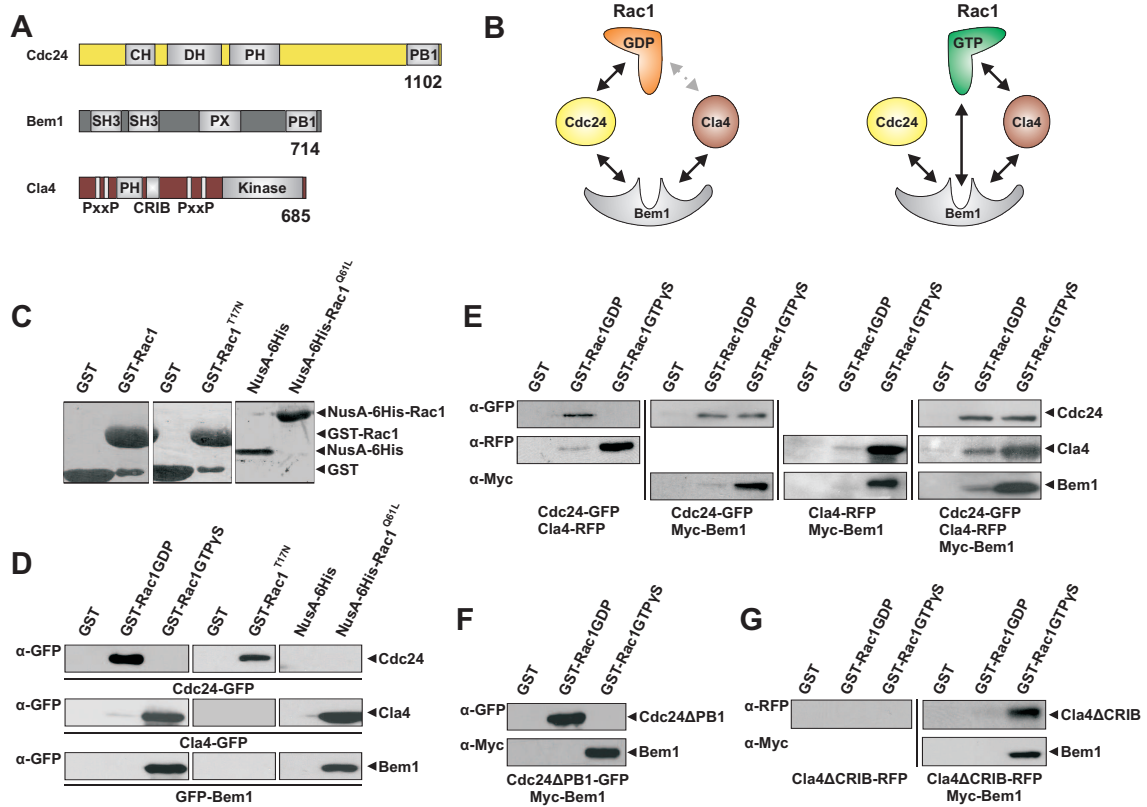


Abbildung 2.3: Bem1, Cdc24, Rac1 und Cla4 bilden einen Multiproteinkomplex. **A)** Domänenstruktur von *U. maydis* Cdc24, Bem1 und Cla4. Cdc24 enthält eine Calponin-Homologie (CH), eine Dbl-Homologie (DH), eine Pleckstrin-Homologie (PH) und eine C-terminale Phox und Bem1 Domäne (PB1). Bem1 umfasst zwei N-terminale SH3-Domänen, eine zentrale Phox-Homologie (PX) und eine C-terminale PB1-Domäne. Cla4 beinhaltet eine N-terminale PH-Domäne, eine „Cdc42 und Rac1 interaktive Bindungs-“ Domäne (CRIB), mehrere PxxP Motive, die mit SH3-Domänen interagieren können und eine C-terminale Kinase-Domäne. **B)** Schematische Darstellung aller durch Ko-Präzipitation detektierten Interaktionen. Die schwarzen durchgezogenen Linien repräsentieren starke, die grauen gestrichelten Linien schwache Interaktionen. **C)** Wildtyp GST-Rac1, dominant negatives GST-Rac1^{T17N} und dominant aktives NusA-His₆-Rac1^{Q61L} wurden in *E. coli* exprimiert und durch Affinitäts-Chromatographie gereinigt. Proteinproben wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF Membran übertragen und über Ponceau-S Färbung nachgewiesen. GST und NusA-His₆ dienten als Kontrolle. **D)** Für die Ko-Präzipitationen wurde GST-Rac1 mit GDP oder nicht hydrolysierbarem GTPγS beladen. GST-Rac1^{T17N} und NusA-His₆-Rac1^{Q61L} wurden ohne künstliche Beladung eingesetzt. Gleiche Anteile der GTPasen wurden mit *U. maydis* Proteinextrakten von Zellen inkubiert, die GFP-markierte Versionen von Cdc24, Cla4 oder Bem1 überexprimierten. Die Komplexe wurden mit Hilfe von Glutathion-Agarose (GST-Rac1 and GST-Rac1^{T17N}) oder Nickel-Sepharose (NusA-His₆-Rac1^{Q61L}) präzipitiert, im SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF Membran transferiert. Cdc24-GFP, Cla4-GFP und GFP-Bem1 wurden mit Hilfe eines monoklonalen GFP-Antikörpers nachgewiesen. **E)** Die gezeigten Ko-Präzipitationen wurden wie in (D) beschrieben durchgeführt, jedoch mit Proteinextrakten, die entweder paarweise Kombinationen von Cdc24-GFP, Cla4-RFP und Myc-Bem1 enthielten, oder alle drei Fusionsproteine gemeinsam. **F)** Gezeigt sind Ko-Präzipitationen mit Extrakten, die Myc-Bem1 und Cdc24ΔPB1-GFP enthielten. **G)** Ko-Präzipitationen mit Extrakten, die entweder Cla4ΔCRIB-RFP alleine, oder in Kombination mit Myc-Bem1 enthielten.

on von Cdc24, Bem1 und Cla4 in einem Ansatz mit Rac1-GTP γ S gezeigt werden (Abb. 2.3 E). Interessanterweise konnte die Komplexbildung auch mit Rac1-GDP nachgewiesen werden, wenn auch mit geringerer Affinität (Abb. 2.3 E).

Durch Epistasisanalyse, Kollokalisationsstudien und Kopräzipitationsexperimente konnte bestätigt werden, dass ein Multiproteinkomplex bestehend aus dem GEF Cdc24, der GTPase Rac1, der Kinase Cla4 und dem interaktionsvermittelnden Protein Bem1 das polare Wachstum in *U. maydis* kontrolliert. Die nachfolgenden Experimente konzentrierten sich auf die dynamische Regulation der Aktivität dieses Signalmoduls.

2.1.2 Das Kreuzungstyp-abhängige filamentöse Wachstum von *U. maydis* basiert auf der Cdc24-abhängigen Aktivierung von Rac1

Um die Pflanze infizieren zu können, bildet *U. maydis* ein dikaryotisches Filament. Haploide Sporidien mit unterschiedlichem *a* und *b* Paarungstyp nehmen einander auf der Pflanzenoberfläche wahr und bilden Paarungshyphen entlang des Pheromongradienten aus, die an der Spitze fusionieren (Abb. 2.4 A) (Banuett and Herskowitz, 1989; Snetselaar et al., 1996). Die folgende Bildung und das Wachstum des dikaryotischen Filaments wird durch den multiallelischen *b*-Locus reguliert, der für ein Paar Homeodomänen Proteine, bW und bE, kodiert. Diese Proteine können ein Heterodimer bilden, wenn sie von unterschiedlichen *b*-Loci stammen und so als Transkriptionsfaktor fungieren (Kämper et al., 1995). Die Überexpression eines solchen funktionalen bW2/bE1 Heterodimers unter der Kontrolle des induzierbaren *crg* Promotors (Abb. 2.4 B), ist in dem Stamm AB31 ausreichend, um filamentöses Wachstum zu induzieren (Brachmann et al., 2001).

Obwohl bereits viele Gene identifiziert werden konnten, die durch den b-Transkriptionsfaktor reguliert werden (Brachmann et al., 2001; Heimel et al., 2010a,b; Wahl et al., 2010), ist der genaue molekulare Mechanismus der Filamentinduktion noch nicht aufgeklärt. Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, hängt das Wachstum des *U. maydis* Filaments von Rac1 ab. Die Expression des *rac1* Genes wird jedoch nicht vom bW/bE Heterodimer beeinflusst (Mahlert et al., 2006). Es ist daher anzunehmen, dass es durch b-Induktion zur Stimulation der Aktivität von Rac1 kommt. Darum wurde die Menge an aktivem Rac1-GTP vor und nach der Induktion von bW2/bE1 in dem Stamm AB31 bestimmt. Zur besseren Detektion wurde die GTPase am genomischen Locus mit einem dreifachen HA-Epitop versehen (Abb. 2.4 B). Zur Präzipitation der aktiven GTPase wurde die CRIB-Domäne der PAK Kinase Smu1 (Smith et al., 2004) genutzt, die selektiv an die aktiven Formen von Rac1 und Cdc42 bindet (Leveleki et al., 2004). Unter induzierenden Bedingungen führte die Überexpression von bW2/bE1 zu

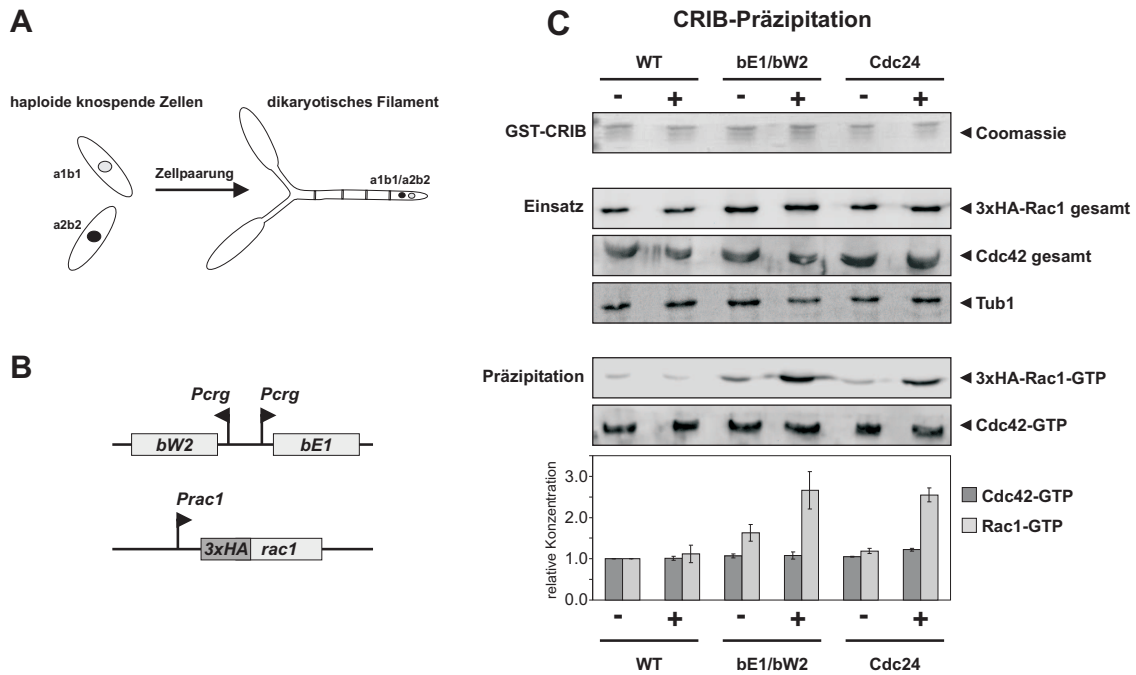


Abbildung 2.4: Die Filamentinduktion führt zu einem erhöhten Level von aktivem Rac1-GTP. **A)** Schematische Darstellung der morphologischen Transition von *U. maydis*. Haploide Zellen unterschiedlichen Kreuzungstyps (a1b1 und a2b2) fusionieren an der Spitze um eine dikaryotische Hyphe zu bilden. **B)** Der Stamm AB31 exprimiert ein aktives Dimer aus bW2 und bE1 unter der Kontrolle des induzierbaren *crg* Promotors. Zur besseren Detektion wurde *rac1* am genomischen Locus mit einem dreifachen HA-Epitop versehen. **C)** Determination der Menge an aktivem Rac1-GTP und Cdc42-GTP bevor (-) und vier Stunden nach der Induktion (+) des heterodimeren Transkriptionsfaktors bE1/bW2 und des GEFs Cdc24. GST-CRIB_{Smu1} wurde in *E. coli* überexprimiert und über Affinitäts-Chromatographie gereinigt. Mit GST-CRIB_{Smu1} beladene GSH-Agarose wurde mit den *U. maydis* Proteinextrakten inkubiert. Präzipitierte Proteine wurden auf eine PVDF Membran transferiert und durch Immunodetektion sichtbar gemacht. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte dreier unabhängiger Versuche. Die Standardabweichung wird von den Balken repräsentiert.

einem deutlich erhöhten Niveau von Rac1-GTP, nicht jedoch von Cdc42-GTP (Abb. 2.4 C). Interessanterweise kam es durch die Überexpression von Cdc24 zu einem vergleichbaren Anstieg der Menge an aktivem Rac1-GTP (Abb. 2.4 C). Die Aktivierung von Rac1 während der b-Induktion des filamentösen Wachstums scheint daher durch den GEF Cdc24 zu erfolgen.

2.1.3 Die b-abhängige Filamentinduktion wird durch einen Abbau von Cdc24 begleitet

Wie bereits in Abschnitt (2.1.1) beschrieben, wurde eine C-terminale GFP-Fusion von Cdc24 konstitutiv exprimiert, um die Lokalisation des GEFs in knospenden Zellen und

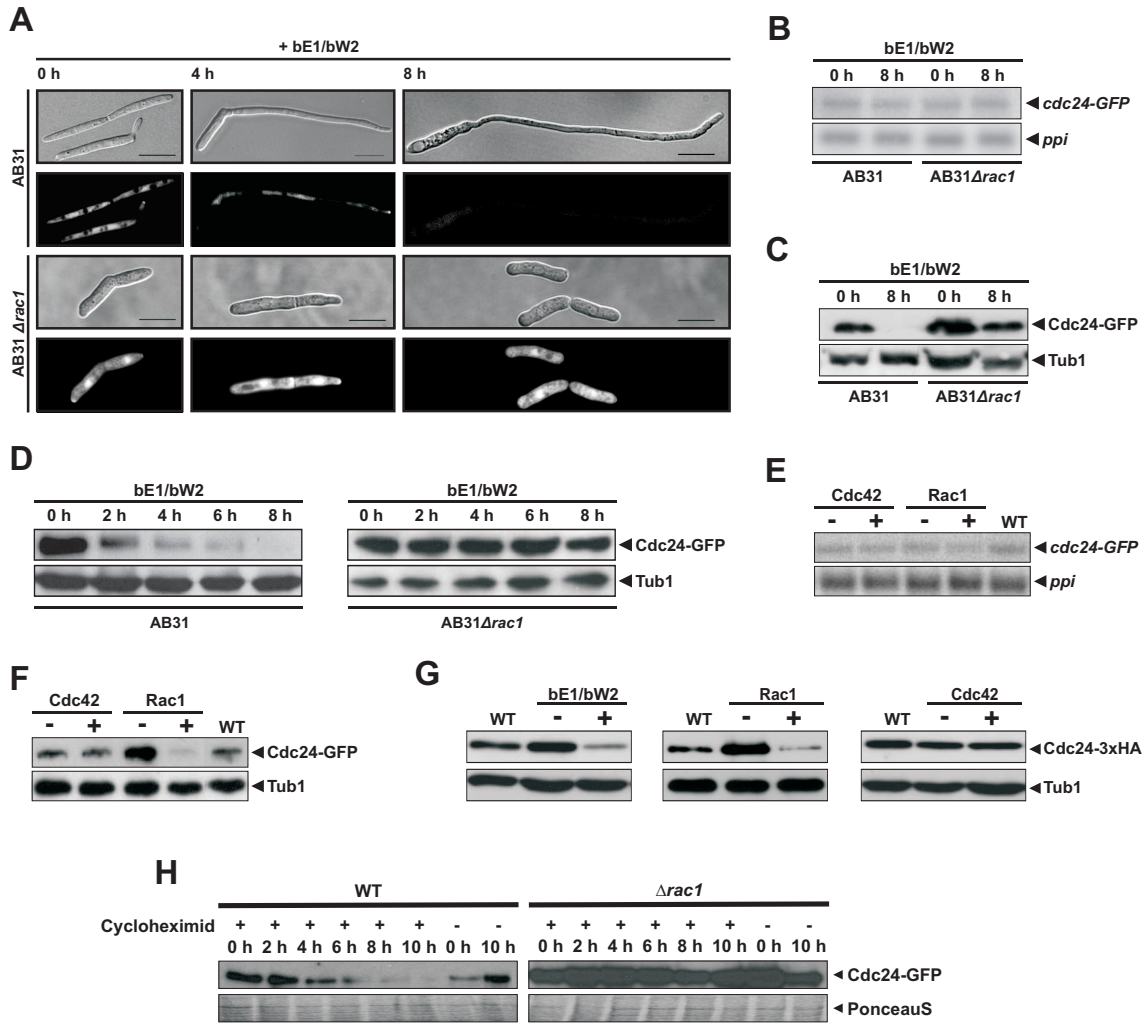


Abbildung 2.5: Cdc24 wird während der vom *b*-Kreuzungstyp abhängigen Filamentinduktion degradiert. **A)** Die Lokalisation von konstitutiv exprimiertem Cdc24-GFP wurde in den Stämmen AB31 und AB31 Δ rac1 verfolgt. DIC und GFP-Fluoreszenz Bilder wurden vor (0 h) und vier (4 h) und acht (8 h) Stunden nach der Induktion der bW2/bE1 Überexpression gemacht. Der Größenstandard repräsentiert 10 μ m. **B)** Analyse der *cdc24-GFP* mRNA Konzentration in den Stämmen AB31 und AB31 Δ rac1 bevor (0 h) und nach der Induktion (8 h) der bW2/bE1 Überexpression. Die mRNA der konstitutiv exprimierten Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerase (*ppi*) diene als Ladekontrolle. **C)** Bestimmung der Cdc24-GFP Proteinmenge in den selben *U. maydis* Kulturen die in (B) zur *cdc24-GFP* mRNA Mengenbestimmung genutzt wurden. Ein monoklonaler Antikörper gegen GFP wurde zum Nachweis von Cdc24 genutzt. Tubulin (Tub1) diene als Ladekontrolle. **D)** Die Menge an Cdc24-GFP wurde vor (0 h) und zu mehreren Zeitpunkten (2 h, 4 h, 6 h, 8 h) nach der bW2/bE1 Induktion bestimmt. **E)** Analyse der *cdc24-GFP* mRNA Menge in konditionalen *rac1* und *cdc42* Mutanten, die die GTPasen unter der Kontrolle des *crg* Promotors exprimierten. Die Zellen wurden unter nicht-induzierenden (-) und induzierenden Bedingungen (+) angezogen. **F)** Bestimmung des Cdc24-GFP Protein Niveaus in den selben Kulturen, die in (E) genutzt wurden. **G)** Kontrolle der Proteinmenge von Cdc24-3xHA, das unter der Kontrolle des endogenen Promotors exprimiert wurde, in AB31 und in konditionalen Mutanten von *rac1* und *cdc42*. Die Zellen wurden unter nichtinduzierenden (-) und induzierenden (+) Bedingungen angezogen. **H)** Inhibition der Translation durch Cycloheximid (100 μ g/ml) in Kulturen des Wildtyp und des *rac1* Deletionsstammes, die Cdc24-GFP unter der Kontrolle des *tef* Promotors konstitutiv exprimierten.

2 Ergebnisse

während des filamentösen Wachstums zu bestimmen. Dabei akkumulierte Cdc24-GFP an der Knospenspitze und an der Spitze der Filamente kurz nach der Induktion der bW2/bE1 Überexpression (Abb. 2.5 A)). Überraschenderweise nahm die Intensität der Cdc24-GFP-Fluoreszenz während des b-induzierten filamentösen Wachstums drastisch ab, obwohl die Expression der GFP-Fusion unter der Kontrolle des konstitutiven *tef* Promotors erfolgte (Abb. 2.5 A). Die Analyse der mRNA Menge bestätigte, dass es während der bW2/bE1 Überexpression zu keiner Veränderung des *cdc24-GFP* Niveaus kam (Abb. 2.5 B). Die Bestimmung der Cdc24-GFP Proteinmenge bestätigte hingegen, dass das Cdc24-GFP Niveau durch die Überexpression des Transkriptionsfaktors drastisch reduziert wurde (Abb. 2.5 C). Die Abnahme der Cdc24 Konzentration begann dabei offenbar direkt nach der b-Induktion, da bereits nach zwei Stunden Wachstum unter induzierenden Bedingungen das Cdc24-GFP Niveau um etwa die Hälfte reduziert war (Abb. 2.5 D). Um einen möglichen Einfluss der konstitutiven Expression auf den beobachteten Abfall der Cdc24-GFP Konzentration auszuschließen, wurde *cdc24* auch am genomischen Locus mit einem dreifachen HA-Epitop versehen. Auch das endogen exprimierte Cdc24-3xHA wurde nach der b-Induktion reduziert (Abb. 2.5 G). Die Tatsache, dass die Überexpression von bW2/bE1 auch die Aktivierung von Rac1 zur Folge hat, führte zu der Vermutung, dass die beobachtete posttranskriptionelle Regulation von Cdc24 durch die Aktivierung von Rac1 ausgelöst wird. Eine Deletion des *rac1* Genes in dem Stamm AB31 Δ *rac1* verhinderte sowohl die Filamentbildung, als auch die negative Regulation der Cdc24 Menge (Abb. 2.5 A und C). Die Überexpression von Rac1 hatte hingegen eine destabilisierende Wirkung sowohl auf das ektopisch, als auch auf das endogen exprimierte Cdc24 Protein, die mit der von bW2/bE1 vergleichbar war (Abb. 2.5 F und G). Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass die Aktivierung von Rac1 während des filamentösen Wachstums von *U. maydis* offenbar zu einer negativen Regulation des GEFs Cdc24 führt.

Sowohl die Stärke der GFP-Fluoreszenz, als auch die detektierte Menge an Protein war im Δ *rac1* Hintergrund deutlich erhöht (Abb. 2.5 A und C). Dieser stabilisierende Effekt der Abwesenheit von Rac1, konnte auch bei endogen exprimiertem Cdc24-3xHA bestätigt werden (Abb. 2.5 G). Dies weist darauf hin, dass die Rac1-abhängige negative Rückkopplungs-Regulation sowohl während des b-induzierten filamentösen Wachstums, als auch während der Knospung der haploiden Zelle, die Menge an Cdc24 beeinflusst. Weder die Deletion, noch die Überexpression von *cdc42* hatte einen Effekt auf die Stabilität von Cdc24 (Abb. 2.5 F und G). Dies bestätigt die Hypothese, dass Cdc24 während des polaren Wachstums als Rac1-GEF fungiert. Um zu untersuchen, ob es sich bei der Regulation von Cdc24 um einen Abbau des GEFs handelt, oder um eine Inhibition der Translation, wurde die Translation durch Zugabe von Cycloheximid im Wildtyp und im *rac1* Deletionsstamm inhibiert. Das konstitutiv exprimierte Cdc24-GFP Niveau begann

2 Ergebnisse

nach Zugabe von Cycloheximid im Wildtyp mit einer ungefähren Halbwertszeit von vier Stunden abzufallen. Im *rac1* Deletionshintergrund blieb Cdc24-GFP hingegen weitgehend stabil (Abb. 2.5 H). Dies zeigt, dass es sich bei dem beobachteten Abfallen des Cdc24 Niveaus um einen Abbau des GEFs handelt. Die Überexpression von dominant negativem Rac1^{T17N} (Stacey et al., 1991) hatte keine negativen Auswirkungen auf die Menge an Cdc24 in der Zelle (Abb. 2.6 A). Dies weist darauf hin, dass Rac1 durch den GEF aktivierbar sein muss und somit der Übergang vom GDP- zum GTP-gebundenen Zustand für die negative Regulation der Cdc24 Menge entscheidend ist. Diese Schlussfol-

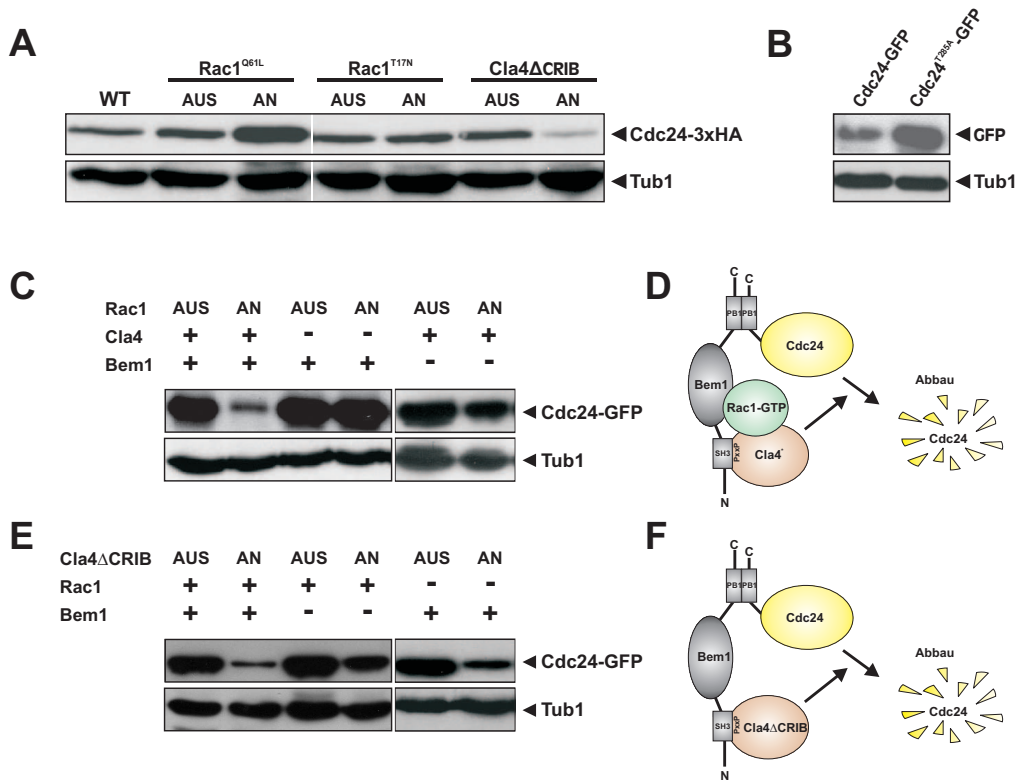


Abbildung 2.6: Die negative Rückkopplungsregulation von Cdc24 hängt von der Bildung eines funktionalen Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1 Signalmoduls ab. **A)** Bestimmung des Einflusses der Überexpression von Rac1^{Q61L}, Rac1^{T17N} und Cla4ΔCRIB auf das endogene Niveau von Cdc24-3xHA. Die Zellen wurden in nicht induzierendem Medium angezogen (AUS) und anschließend acht Stunden in induzierendem Medium inkubiert (AN). **B)** Vergleich des Proteinniveaus der dominant negativen Variante Cdc24^{T283A} mit dem von Wildtyp Cdc24. Beide GFP-Fusionen wurden unter den gleichen Bedingungen konstitutiv exprimiert. **C)** Der Effekt der Rac1 Überexpression auf die Cdc24-GFP Konzentration wurde in der An- (+) und Abwesenheit (-) des Rac1 Effektors Cla4 und des Gerüstproteins Bem1 untersucht. Dabei wurde Rac1 ektopisch in Wildtypzellen, in *cla4* Deletionsmutanten und in einer konditionalen *bem1* Mutante überexprimiert. Die analysierten Proben wurden vor (AUS) und acht Stunden nach der Rac1 Induktion (AN) genommen. **D)** Aktives Rac1-GTP braucht sowohl Cla4, als auch Bem1 um den Abbau von Cdc24 zu induzieren. **E)** Die Menge an Cdc24-GFP wurde vor (AUS) und nach (AN) der Induktion der Überexpression der konstitutiv aktiven Kinase Cla4ΔCRIB in Wildtyp Zellen, in $\Delta rac1$ Mutanten und in konditionalen *bem1* Mutanten bestimmt. Die Anzucht der Kulturen erfolgte wie in (A) beschrieben. **F)** Die konstitutiv aktive Kinase Cla4ΔCRIB benötigt die brückenbildende Funktion von Bem1 um Cdc24 dem Abbau zuzuführen.

gerung wurde durch die Beobachtung bestätigt, dass mutiertes Cdc24^{T285A} (Aghazadeh et al., 1998), welches keine GEF Aktivität mehr besitzt (in diesem Abschnitt nicht gezeigt, siehe Abb. 2.20 B) für einen *in vitro* GEF-Aktivitätstest), im Vergleich zum Wildtyp Cdc24 deutlich stabiler ist (Abb. 2.6 B). Es ist also vermutlich die Aktivierung von Rac1 durch Cdc24, die zur posttranslationalen negativen Rückkopplungsregulation des GEFs führt.

Überraschenderweise führte die Überexpression von konstitutiv aktivem Rac1^{Q61L}, das immer im GTP-gebundenen Zustand vorliegt (Ziman et al., 1991), zu einer deutlichen Stabilisierung des endogenen Cdc24-3xHA Niveaus (Abb. 2.6 A). Die Überexpression der konstitutiv aktiven GTPase ist für die Zellen toxisch (Mahlert et al., 2006). Es konnte jedoch ausgeschlossen werden, dass die unerwartete Stabilisierung von Cdc24 durch toxische Seiteneffekte der Rac1^{Q61L} Überexpression zustande kam, da eine Überproduktion von Wildtyp Rac1 auch in Gegenwart von Rac1^{Q61L} noch in der Lage war, den Abbau von Cdc24 zu induzieren (nicht gezeigt). Auf einen möglichen Mechanismus, wie die Stabilisierung von Cdc24 durch Rac1^{Q61L} zustande kommt wird in Abschnitt 2.2.4 genauer eingegangen werden.

2.1.4 Die Bildung eines Cdc24/Rac1/Bem1/Cla4 Komplexes ist für die negative Regulation von Cdc24 essentiell

Wie bereits in Abschnitt (Abb. 2.1.1) dargestellt, bilden Cdc24, Rac1 und Cla4 einen Komplex mit Bem1. In den folgenden Experimenten wurde untersucht, inwieweit diese Komplexbildung für die negative Regulation von Cdc24 eine Rolle spielt. Um ungewollte Nebeneffekte der bW2/bE1 Überexpression, z.B. durch Interferenz mit anderen durch b-Induktion angeschalteten Signalmodulen zu vermeiden, wurde die Negativregulation von Cdc24 in den nachfolgenden Experimenten durch die Überexpression von Rac1 induziert. Zunächst wurde überprüft, ob die Kinase Cla4 für die Regulation von Cdc24 wichtig ist. Tatsächlich war Rac1 in einem *cla4* Deletionshintergrund nicht mehr in der Lage die Cdc24 Proteinkonzentration negativ zu beeinflussen (Abb. 2.6 C). Auch die Anwesenheit von Bem1 war für die Negativregulation von Cdc24 durch Rac1 essentiell. Eine Depletion von Bem1 verhinderte alle negativen Effekte der Rac1 Überexpression auf die Menge von Cdc24 in der Zelle (Abb. 2.6 C). Die daraus resultierende Hypothese, dass die negative Regulation von Cdc24 in einem Cdc24/Rac1/Cla4/Bem1 Komplex stattfindet (Abb. 2.6 D), wurde außerdem durch die Beobachtung unterstützt, dass Cdc24 Δ PB1, das nicht mehr mit Bem1 interagieren kann, immun gegen die Auswirkungen der Rac1 Überexpression war (Abb. 2.8 C).

2.1.5 Die Phosphorylierung von Cdc24 durch Cla4 führt zum Abbau des GEFs

Die Tatsache, dass die negative Regulation von Cdc24 durch Rac1 von der Anwesenheit der Cla4 Kinase abhängt, lässt den Schluss zu, dass die Aktivierung von Cla4 durch Rac1-GTP den Abbau von Cdc24 induziert. Überexpression der konstitutiv aktiven Cla4 Δ CRIB Kinase führte ebenfalls zum Abbau von Cdc24 (Abb. 2.6 E). Wie zu erwarten, war diese Destabilisierung von Cdc24 durch Cla4 Δ CRIB unabhängig von der Anwesenheit von Rac1 (Abb. 2.6 E). In Abwesenheit von Bem1 wurde jedoch wieder eine Stabilisierung von Cdc24 beobachtet (Abb. 2.6 E und F). Die Annahme, dass die Stimulation der Cla4 Kinaseaktivität durch Rac1-GTP zum Abbau von Cdc24 führt, konnte auch während des b-induzierten filamentösen Wachstums von *U. maydis* durch die Konstruktion einer analog-sensitiven Cla4-Kinase bestätigt werden (Das Konstrukt wurde freundlicherweise von Julia Engel zur Verfügung gestellt). Hierzu wurde in Cla4 das Methionin an Position 629 durch ein Alanin substituiert. Die Einführung dieser Mutation in das endogene *cla4* Gen des Stammes AB31 führte zur Expression der analog sensitiven

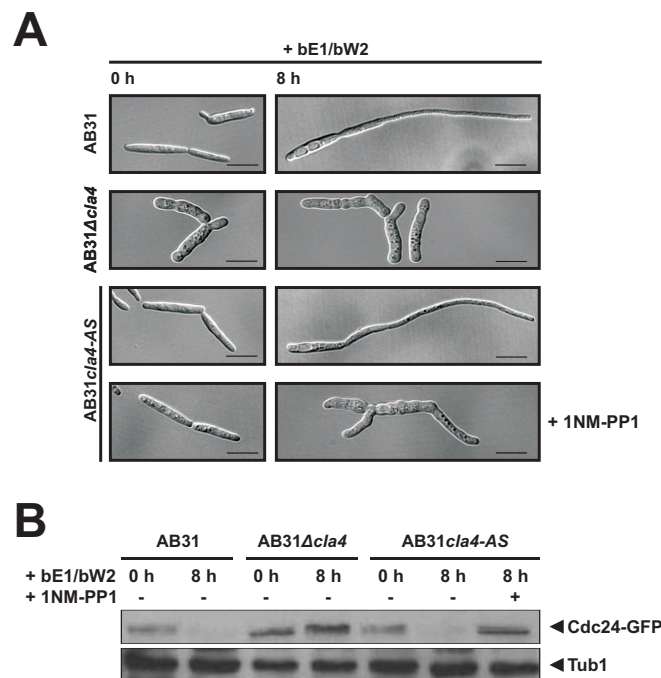


Abbildung 2.7: Der Abbau von Cdc24 hängt während des filamentösen Wachstums von der Cla4 Kinaseaktivität ab. A) Erscheinungsbild von Zellen der Stämme AB31, AB31 Δ cla4 und AB31cla4-AS bevor (0 h) und nach der Induktion (8 h) der bW2/bE1 Überexpression. AB31cla4-AS exprimiert die analog sensitive Kinase Cla4^{M629A}. Diese Kinase wurde durch die Zugabe des Inhibitors 1NM-PP1 (4-amino-1-tert-butyl-3-(1-napthylmethyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidin) inhibiert. Der Größenstandard entspricht 10 μ m. **B)** Nachweis der Proteinmenge von endogen exprimiertem Cdc24-3xHA in den in (A) gezeigten Zellen. Tubulin diente als Ladekontrolle.

2 Ergebnisse

Kinase Cla4^{M629A} (Liu et al., 1999, 1998; Weiss et al., 2000). Die durch die Mutation erweiterte Nukleotidbindetasche von Cla4^{M629A} ermöglicht die spezifische Bindung des Inhibitors 1NM-PP1 (4-amino-1-tert-butyl-3-(1-naphthylmethyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidin) (Bishop et al., 1998). In Abwesenheit des Inhibitors führte die bW2/bE1 Überexpression in AB31*cla4*^{M629A} zur Ausbildung eines wildtypischen Filaments und zum Abbau von Cdc24 (Abb. 2.7 A und B). Wurden die Kulturen jedoch unter b-induzierenden Bedingungen in Anwesenheit des Inhibitors 1NM-PP1 inkubiert, so konnte weder eine Filamentbildung, noch der Abbau von Cdc24 beobachtet werden (Abb. 2.7 A und B). Die Zellen des Stammes AB31*cla4*^{M629A} verloren nach der Zugabe des Inhibitors an Polarität und rundeten sich deutlich ab. Dieser Phänotyp ist mit dem von AB31 Δ *cla4* Zellen vergleichbar (Abb. 2.7 A). Sowohl das polare Wachstum, als auch der Abbau von Cdc24 sind demnach von der Aktivität der Kinase Cla4 abhängig.

Um zu überprüfen, ob die Autoregulation von Cdc24 von einer direkten Phosphorylierung des GEFs durch Cla4 abhängt, wurde ein Testsystem konzipiert. Dieses basierte auf der Annahme, dass eine effektive Phosphorylierung eine direkte Interaktion erfordert, die im Normalfall durch Bem1 vermittelt wird (Abb. 2.8 A). Um dies zu überprüfen, wurde die zweite SH3-Domäne von Bem1 (Abb. 2.3 A), die die Bindung von Cla4 an Bem1 vermittelt, N-terminal an Cdc24 Δ PB1 fusioniert. Durch diese Fusion wurde der stabilisierende Effekt der Deletion der PB1-Domäne aufgehoben. Dies zeigt, dass das Konstrukt SH3-Cdc24 Δ PB1 ein Substrat für den durch Cla4 Δ CRIB induzierten Abbau darstellt (Abb. 2.8 D). Daraus kann abgeleitet werden, dass die brückenbildende Funktion von Bem1 durch die direkte Fusion der SH3-Domäne an Cdc24 ersetzt werden kann (Abb. 2.8 A). Das Testsystem wurde in den folgenden Experimenten genutzt, um die Region innerhalb von Cdc24 zu identifizieren, die für den durch Cla4 induzierten Abbau des GEFs verantwortlich ist. Hierzu wurden mehrere Fragmente von Cdc24 an ihrem N-Terminus mit der SH3-Domäne versehen (Abb. 2.8 B). Das jeweilige Fragment wurde zur Kontrolle auch ohne SH3-Domäne getestet. Analysen der Proteinstabilität in Gegenwart von Cla4 Δ CRIB zeigten, dass die 395 Aminosäuren umfassende Region zwischen der PH- und der PB1-Domäne von Cdc24 ausreichend war, um als Substrat für Cla4 Δ CRIB zu fungieren (Abb. 2.8 B und D). Wurde in dem Stamm, der das entsprechende Fragment als N-terminale SH3-Fusion exprimiert, Cla4 Δ CRIB nur kurz (2 h) induziert und der Zellaufschluss in Anwesenheit von Phosphatase Inhibitoren durchgeführt, so konnten im SDS-Gel Varianten des Cdc24 Fragments mit geringerer Mobilität nachgewiesen werden (Abb. 2.8 F). Es handelte sich bei der beobachteten Modifikation um eine Phosphorylierung, da in Anwesenheit von aktiven Phosphatasen präparierte Proteinextrakt keine modifizierten Varianten enthielten (Abb. 2.8 F). Um nachzuweisen, dass die Phosphorylierung des Cdc24 Fragments von der Kinaseaktivi-

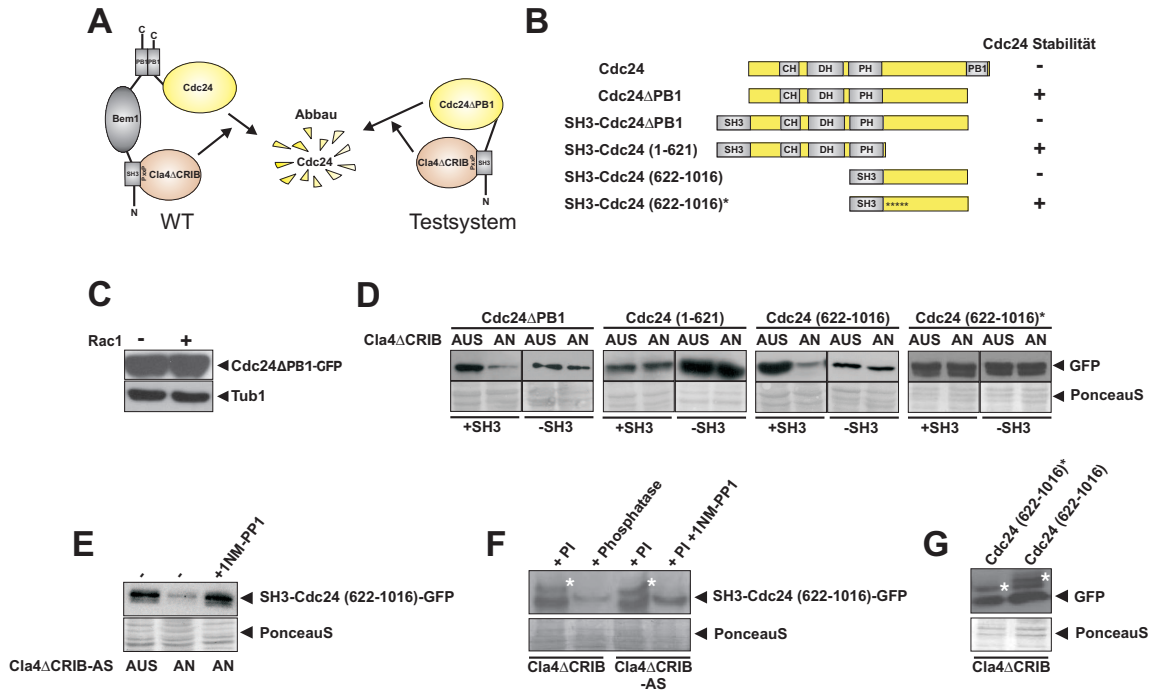


Abbildung 2.8: Der Bereich zwischen PH- und PB1-Domäne wird durch Cla4 Aktivität phosphoryliert und abgebaut. **A)** Schematische Darstellung des Testsystems zur Identifikation des Cdc24 Fragments, dass für den Cla4 induzierten Abbau erforderlich ist. Normalerweise interagiert Bem1 mit Cdc24 über die C-terminale PB1-Domäne und mit Cla4 über eine seiner SH3-Domänen. Diese Brückenbildende Funktion wird im Test durch die N-terminale Fusion der zweiten SH3-Domäne von Bem1 an das zu testende Cdc24 Fragment ersetzt. **B)** Übersicht über die getesteten Cdc24 Fragmente. **C)** Analyse der Proteininstabilität einer Cdc24ΔPB1 Mutante in Abwesenheit (-) und bei Überexpression (+) von Rac1. **D)** Analyse der Proteinmenge der C-terminalen GFP-Fusionen der in (B) gezeigten Cdc24 Fragmente. Diese wurden als N-terminale Fusionen mit der SH3-Domäne von Bem1 (+SH3) und zur Kontrolle ohne SH3-Domäne (-SH3) ektopisch konstitutiv in Δ*rac1* Stämmen exprimiert. Die analysierten Proben wurden vor (AUS) und sechs Stunden nach der Induktion der Überexpression von Cla4ΔCRIB (AN) genommen. **E)** Nachweis der Proteinmenge des für den Abbau durch Cla4 ausreichenden Fragmentes SH3-Cdc24(622-1016)-GFP bevor (AUS) und sechs Stunden nach der Induktion der Überexpression (AN) der analog sensitiven Kinase Cla4ΔCRIB^{M629A}, abgeknüpft durch Cla4ΔCRIB-AS. Die Anzucht der Kulturen erfolgte in der An- und Abwesenheit des Kinaseinhibitors 1NM-PP1 (4-amino-1-tert-butyl-3-(1-naphthylmethyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidin). **F)** Nachweis der Modifikation von SH3-Cdc24(622-1016)-GFP durch Cla4ΔCRIB Kinaseaktivität. Cla4ΔCRIB überexprimierende Zellen wurden in Anwesenheit von Phosphatase Inhibitoren (+PI) oder Phosphatasen aufgeschlossen. Die Überexpression von Cla4ΔCRIB-AS erfolgte in An- und Abwesenheit des Inhibitors 1NM-PP1. Der Zellaufschluss wurde in beiden Fällen nach Zugabe von Phosphatase Inhibitoren durchgeführt. Die modifizierten Varianten sind durch ein (*) gekennzeichnet. **G)** Nachweis der Phosphorylierung von SH3-Cdc24(622-1016)-GFP und dem stabilisierten SH3-Cdc24(622-1016)*-GFP zwei Stunden nach der Induktion der Überexpression von Cla4ΔCRIB. Die Zellen wurden in Anwesenheit von Phosphatase Inhibitoren (+PI) aufgeschlossen.

2 Ergebnisse

tät von Cla4 Δ CRIB abhängt, wurde die analog sensitive Variante Cla4 Δ CRIB^{M629A} in dem Teststamm exprimiert. Cla4 Δ CRIB^{M629A} war in der Lage bei Überexpression das Fragment SH3-Cdc24(622-1016)-GFP zu destabilisieren (Abb. 2.8 E). Auch konnten die modifizierten Varianten des Cdc24-Fragments in Anwesenheit von Phosphatase Inhibitoren detektiert werden (Abb. 2.8 F). Die Inhibition von Cla4 Δ CRIB^{M629A} durch den Inhibitor 1NM-PP1 verhinderte sowohl den Abbau von SH3-Cdc24(622-1016)-GFP, als auch dessen Modifikation (Abb. 2.8 E und F). Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass der Abbau von Cdc24 eine direkte Interaktion mit Cla4 erfordert, was zur Phosphorylierung von Cdc24 durch Cla4 im Bereich zwischen der PH- und der PB1-Domäne führt. Diese Phosphorylierung ist vermutlich das Signal für den Abbau des GEFs.

Die Deletion des entsprechenden Bereiches innerhalb von Cdc24 am genomischen Locus (*cdc24 Δ 622-1016*) führte zu einer deutlichen Stabilisierung des GEFs und gleichzeitig zu einem leichten Zellpolaritätsverlust (Abb. 2.9 A, B und C). Um die für den Abbau verantwortliche Proteinsequenz weiter einzukreisen, wurden kleinere interne Deletionen im Bereich zwischen der PH- und der PB1-Domäne vorgenommen (Abb. 2.9 A). Dabei stellte sich heraus, dass die ersten 62 Aminosäuren unmittelbar im Anschluss an die PH-Domäne für die Destabilisierung von Cdc24 kritisch sind (Abb. 2.9 C). Diese kurze Sequenz beinhaltet insgesamt 9 Serine und Threonine, die durch die Serin/Threonin Kinase Cla4 phosphoryliert werden könnten (Abb. 2.9 A). Diese möglichen Phosphorylierungsstellen wurden einzeln oder, bei direkter Nachbarschaft, in Zweierkombinationen am genomischen Locus zu Alanin mutiert. Keine der eingeführten Einzel-/bzw. Doppel-Mutationen führte zu einer signifikanten Stabilisierung von Cdc24 (Abb. 2.9 A und D). Der Austausch aller in Frage kommenden Serine und Threonine in einer Mutante, Cdc24*, führte hingegen zu einem deutlich erhöhten Cdc24 Niveau (Abb. 2.9 D). Die Einführung der selben Mutationen in das 394 bp große, für den Cla4 induzierten Abbau im Testsystem ausreichende Fragment, stabilisierte das SH3-Fusionsprotein deutlich (Abb. 2.8 B und D). Nach Zugabe von Phosphatase Inhibitoren konnte auch für das mutierte Fragment SH3-Cdc24(622-1016)*-GFP eine Phosphorylierung durch Cla4 Δ CRIB nachgewiesen werden (Abb. 2.8 G). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Fragment noch weitere potentielle Phosphorylierungsstellen enthält. Um auszuschließen, dass die erhöhte Konzentration der stabilisierten Cdc24 Mutanten von einem Verlust der GEF Aktivität herrührt, wurde ihre Fähigkeit, Rac1 zu aktivieren, durch CRIB-Präzipitation von aktivem Rac1-GTP nachgewiesen. Dabei konnte nach Überexpression aller Mutanten ein Anstieg der Rac1-GTP Menge erzielt werden, der mit dem durch WT-Cdc24 induzierten vergleichbar war (Abb. 2.9 E).

Um zu überprüfen, ob die Entfernung der potentiellen Phosphorylierungsstellen in Cdc24* auch Auswirkungen auf die Regulation von Cdc24 während des filamentö-

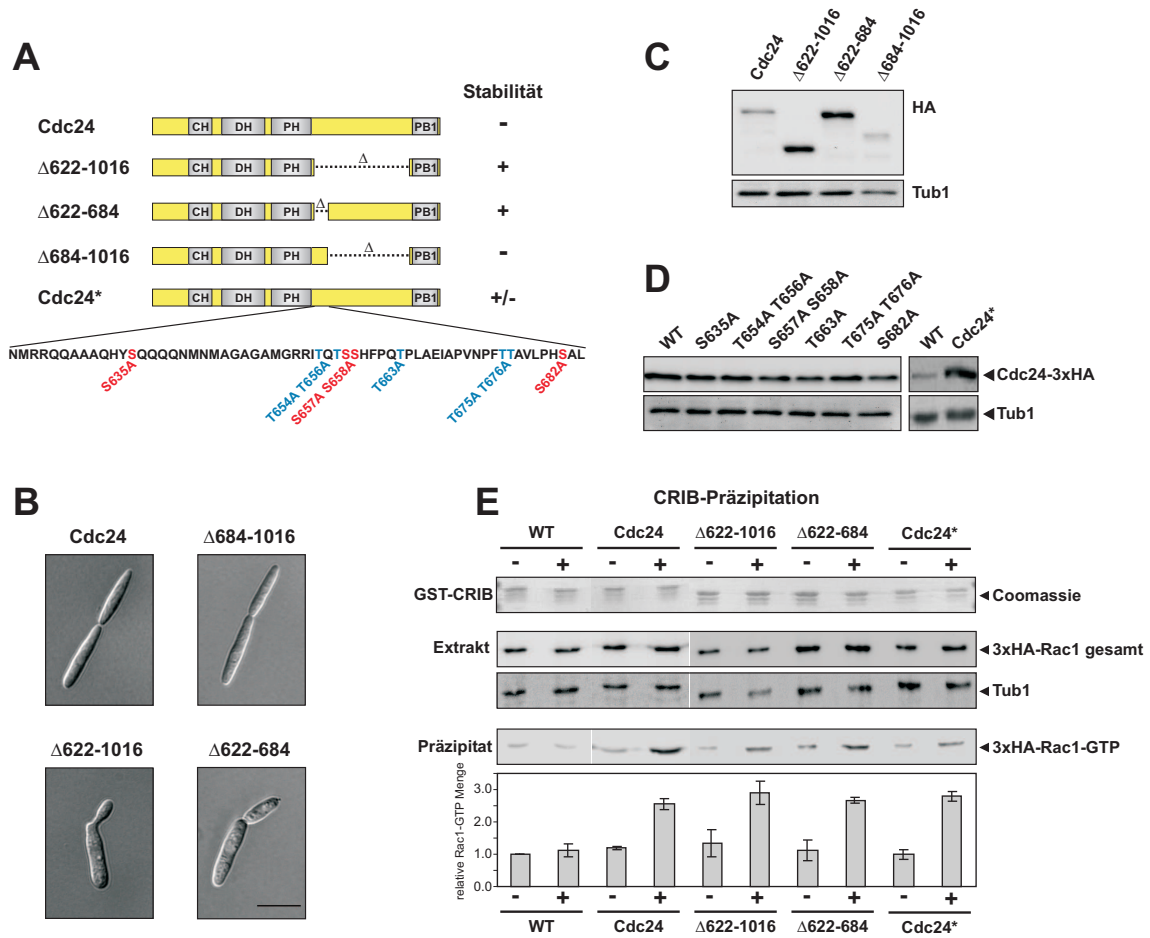


Abbildung 2.9: Eine Region von 62 Aminosäuren ist für den Cla4-induzierten Abbau von Cdc24 erforderlich. **A)** Die schematische Darstellung zeigt die am genomischen Locus in *cdc24* deletierten Bereiche. In der untersten Reihe ist die für den Cla4-induzierten Abbau kritische Aminosäuresequenz dargestellt. Die für die Phosphorylierung in Frage kommenden Serine (rot) und Threonine (blau) sind hervorgehoben. **B)** Phänotyp von *U. maydis* Zellen, die die angegebenen Cdc24 Varianten am genomischen Locus exprimieren. Der Größenstandard entspricht 10 μ m. **C)** Untersuchung der Proteinkonzentrationen der endogen exprimierten Cdc24 Versionen. Diese wurden zur Visualisierung mit einem 3xHA-Epitop am C-Terminus versehen. **D)** Vergleich der Proteinmenge der Cdc24 Mutanten, in denen jeweils eine der potentiellen Phosphorylierungsstellen mutiert ist und der Mutante Cdc24*, in der alle potentiellen Phosphorylierungsstellen mutiert sind, mit der Proteinmenge des Wildtyp GEFs. Die Mutationen wurden in das *cdc24* Gen am genomischen Locus eingeführt und C-terminal an 3xHA fusioniert. **D)** Nachweis des Niveaus von aktivem Rac1-GTP in Zellen, die die Cdc24 Varianten überexprimieren. Affinitäts-chromatographisch aufgereinigtes GST-CRIB_{Smu1} wurde an GSH-Agarose gebunden und mit Proteinextrakten von Zellen vor (-) und vier Stunden nach der Induktion der ektopischen Überexpression (+) von Cdc24, Cdc24 Δ 622-1016, Cdc24 Δ 622-684 und Cdc24* inkubiert. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte dreier unabhängiger Messungen. Die Standardabweichung wird durch die Balken angezeigt.

2 Ergebnisse

sen Wachstums hat, wurde die Cdc24* Variante im Stamm AB31 endogen exprimiert. Zu einem Zeitpunkt, als das Proteinniveau von Wildtyp Cdc24 durch die b-Induktion bereits um über fünfzig Prozent reduziert war, war die Menge an Cdc24* nur leicht negativ beeinflusst (Abb. 2.10 A). Dies deutet darauf hin, dass die Entfernung der Phosphorylierungsstellen in Cdc24* die negative Autoregulation während des filamentösen Wachstums deutlich abschwächt. Die Expression des stabilisierten Cdc24* hatte auch Auswirkungen auf den Phänotyp der Zellen. Knospende Zellen waren deutlich länger und an den Knospenspitzen stärker abgerundet. Auch der Zelldurchmesser war

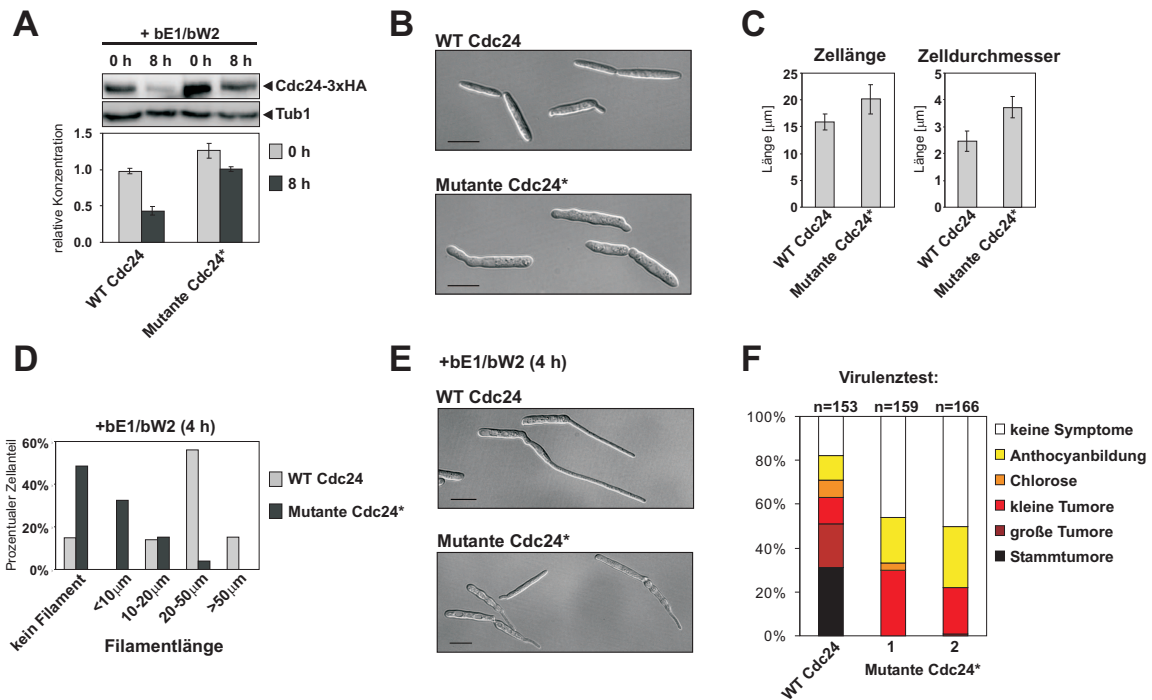


Abbildung 2.10: Die Expression einer stabilisierten Cdc24 Variante interferiert mit der Induktion des filamentösen Wachstums. **A**) Immunonachweis der Mengen von Cdc24 und Cdc24* vor (0 h) und nach (8 h) der Induktion der bW2/bE1 Überexpression. Das Diagramm zeigt die Quantifizierung der detektierten Proteinniveaus. Die Graphik resultiert aus den Mittelwerten dreier unabhängiger Versuche. Der Balken repräsentiert die Standardabweichung. **B**) Erscheinungsbild von *U. maydis* Zellen, die Cdc24 und Cdc24* am genomischen Locus als C-terminale Fusion mit 3xHA exprimieren. Der Größenstandard entspricht 10 μ m. **C**) Quantifizierung (n=50) der durchschnittlichen Länge und des Durchmessers von Zellen, die Cdc24* am genomischen Ort exprimieren. **D**) Quantifizierung (n=100) des prozentualen Anteils der Zellen ohne Filament und mit Filamenten der angezeigten Längen (unter 10 μ m, zwischen 10 und 20 μ m, zwischen 20 und 50 μ m und über 50 μ m) vier Stunden nach der Induktion der bW2/bE1 Überexpression im Wildtyp und in der Cdc24* Mutante. **E**) Phänotyp von AB31 Zellen, die die Cdc24* Mutante am genomischen Locus exprimieren, vier Stunden nach der Induktion der bW2/bE1 Überexpression. Der Größenstandard entspricht 10 μ m. **F**) Die Graphik zeigt das Ergebnis eines Virulenztests mit dem solopathogenen Stamm SG200. Neben dem Wildtyp wurden zwei unabhängige Cdc24* Mutanten getestet. Die Symptome sind durch die in der Legende zugewiesene Farbe repräsentiert. Der prozentuale Anteil der Pflanzen mit den entsprechenden Symptomen an der Gesamtzahl ist im Diagramm gezeigt. Die Anzahl (n) der infizierten Pflanzen ist über den Balken beziffert.

signifikant vergrößert (Abb. 2.10 B). Besonders hervorzuheben ist, dass die Expression von Cdc24* mit der b-induzierten Filamentbildung interferierte. Sowohl die Anzahl, als auch die Länge der durch b-Induktion gebildeten Filamente war in den mutierten Zellen drastisch reduziert (Abb. 2.10 D und E). Bei längerer b-Induktion waren jedoch auch alle Cdc24* Zellen in der Lage, ein Filament auszubilden. Um zu testen, ob sich die deutlich verlangsamte Filamentinduktion auf die Virulenz von *U. maydis* auswirkt, wurden Pflanzeninfektionen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Virulenz eines Cdc24* exprimierenden Stammes im Vergleich zum Wildtyp reduziert war. Während über achtzig Prozent der mit dem Wildtyp infizierten Pflanzen deutliche Merkmale einer *U. maydis* Infektion aufwiesen (z.B. Stammtumore und große Tumore an den Blättern), zeigten nur fünf Prozent der mit der Mutante infizierten Pflanzen schwache Infektionsmerkmale (Chlorose und kleine Gallen an den Blättern) (Abb. 2.10 F). Die Mutante war auch in der Lage, wenn auch verzögert, auf der Pflanze Appressorien auszubilden und in die Pflanze einzudringen (nicht gezeigt). Daher ist anzunehmen, dass der initiale Schritt der Infektion normal ablaufen kann, die reduzierte Virulenz jedoch von der Verzögerung im Infektionsprozess herrührt. Die Pflanze hätte in diesem Fall mehr Zeit, den eindringenden pathogenen Pilz zu bekämpfen.

2.2 Die Aktivität des Bem1/Rac1-GTP/Cla4 Signalmoduls wird durch GAP-Aktivität, den GDI Rdi1 und aktinvermittelte Endozytose auf die Filamentspitze beschränkt

2.2.1 Drei GTPase aktivierende Proteine regulieren während des polaren Wachstums die Rac1-GTPase Aktivität

Es konnte gezeigt werden, dass die Cla4-vermittelte Regulation von Cdc24 für das polare Wachstum während der Knospung und vor allem für die Induktion von Filamenten wichtig ist. Aus dieser Beobachtung ergab sich die Frage nach der biologischen Funktion des Cdc24 Abbaus. Die Entfernung des GEFs aus dem Signalkomplex mit Bem1, Rac1-GTP und Cla4 könnte dadurch erklärt werden, dass ein Verbleiben von Cdc24 im Modul für die Inaktivierung von Rac1-GTP und die anschließende Wiederverwendung der Komponenten des Signalmoduls hinderlich wäre. Um dieser Hypothese nachzugehen, mussten zunächst die GAPs für Rac1 identifiziert werden. Dazu wurden die katalytischen Domänen aller zehn potentiellen *U. maydis* Rho-GAPs in Zellen überexprimiert, die eine Cdc24-GFP Fusion konstitutiv exprimierten. Drei GAP-Domänen zeigten dabei einen Einfluss auf das Cdc24-GFP Niveau (nicht gezeigt). Es handelte sich dabei um die *U. maydis* Homologe von Bem2 und Bem3 und ein *U. maydis* spezifisches mit Rac1

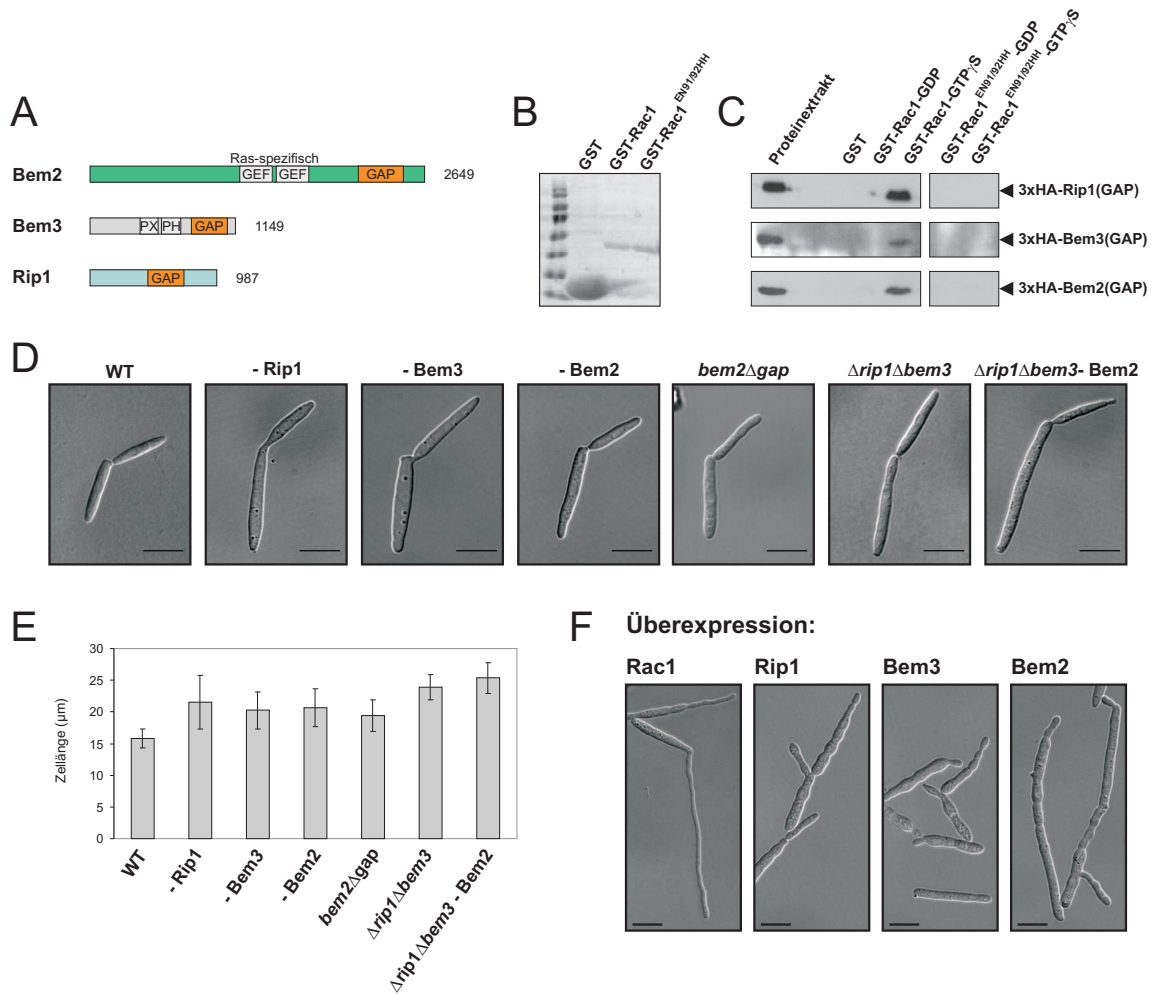


Abbildung 2.11: Drei GTPase aktivierende Proteine (GAPs) haben Einfluss auf die Zellpolarität von *U. maydis*. **A)** Domänenstruktur der drei identifizierten Rac1-GAPs. Bem2 enthält neben der C-terminalen Rho-GTPasen aktivierenden Domäne (GAP) zwei Ras-GEF-Domänen. Bem3 umfasst ausser der C-terminalen GAP-Domäne zwei lipidbindende Domänen, eine Phox (PX) und eine Pleckstrin Homologie (PH) Domäne. In Rip1 konnten neben der GAP-Funktion keine weiteren funktionellen Domänen identifiziert werden. **B)** Wildtyp GST-Rac1 und mutiertes GST-Rac1^{EN91/92HH}, das nicht mehr mit GAPs interagieren kann, wurden in *E. coli* exprimiert und durch Affinitäts-Chromatographie gereinigt. Proteinproben wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und durch Färbung mit „Coomassie Brilliant Blue“ nachgewiesen. GST diente als Kontrolle. **C)** Für die Kopräzipitationen wurde GST-Rac1 mit GDP oder nicht hydrolysierbarem GTP γ S beladen. Gleiche Anteile der GTPasen wurden mit *U. maydis* Protinextrakten von Zellen inkubiert, die die 3xHA-markierten GAP-Domänen von Rip1, Bem2 und Bem3 konstitutiv exprimierten. Dimere aus Rac1 und den GAPs wurden mit Hilfe von Glutathion-Agarose präzipitiert, im SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF Membran transferiert. Die GAP Domänen wurden mit Hilfe eines monoklonalen HA-Antikörpers nachgewiesen. **D)** Phänotyp von Zellen, in denen Rip1, Bem2 und Bem3 einzeln, oder in den angezeigten Kombinationen abwesend sind. Der Größenstandard entspricht 10 μ m. **E)** Quantifizierung (n=50) der Zelllänge der in (D) gezeigten GAP Mutanten. Die Standardabweichung ist durch die Balken angezeigt. **F)** Erscheinungsbild von Zellen, die Rac1, Rip1, Bem3 oder Bem2 überexprimieren. Die Bilder wurden acht Stunden nach Induktion der Überexpression aufgenommen. Der Größenstandard entspricht 10 μ m.

2 Ergebnisse

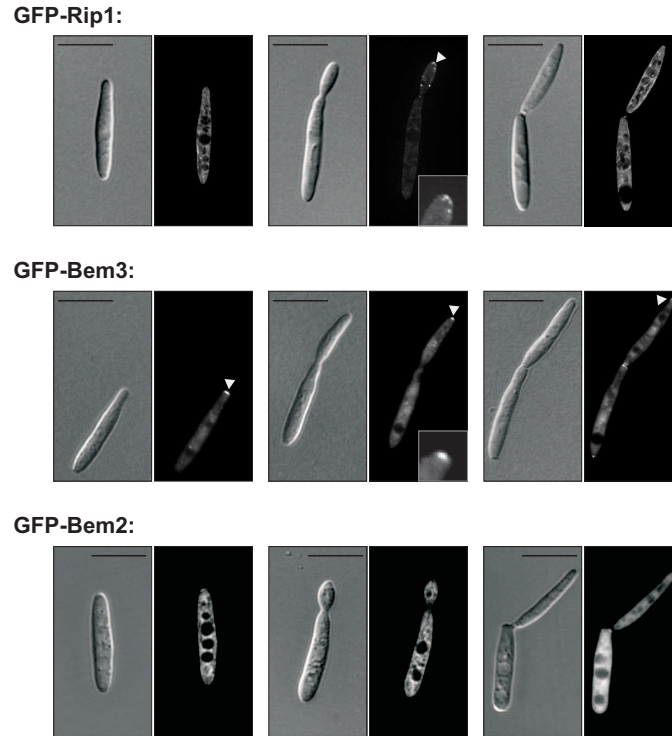


Abbildung 2.12: Die Rac1-GAPs zeigen unterschiedliche Lokalisationsmuster. Gezeigt ist die Lokalisation konstitutiv exprimierter N-terminaler GFP-Fusionen von Rip1, Bem3 und Bem2 in Abwesenheit der entsprechenden Wildtyp GAPs. Es wurden repräsentative Zellen ohne und mit kleiner und großer Knospe ausgewählt. Letztere haben schon beide Septen ausgebildet. Der Größenstandard entspricht $10\ \mu\text{m}$. (Die Photos von Rip1-GFP wurden mir freundlicherweise von Björn Sandrock zur Verfügung gestellt, die von Bem2-GFP von Annette Bauer)

interagierendes Protein, Rip1 genannt (Abb. 2.11 A). Aufgereinigtes Rac1 war in seiner GTP-gebundenen aktiven Konformation in der Lage, die GAP-Domänen aller drei Kandidaten zu präzipitieren (Abb. 2.11 C). Die Interaktionen konnten durch Einführung von zwei Punktmutationen in $\text{Rac1}^{\text{EN91/92HH}}$, die die Bindung von GAP-Domänen verhindern (Rittinger et al., 1997a; Wu et al., 2009), aufgehoben werden (Abb. 2.11 C). Um die biologische Funktion von Rip1, Bem2 und Bem3 zu untersuchen, wurden konditionale Mutanten hergestellt, die das jeweilige Gen unter der Kontrolle des *crg* Promotors am genomischen Locus exprimierten. Die Depletionen von Rip1, Bem2 und Bem3 führten jeweils zu einer deutlichen Hyperpolarisierung der Zellen (Abb. 2.11 D und E). Im Falle von Bem2, das neben der GAP-Domäne noch zwei Ras-GEF Domänen besitzt, konnte durch interne Deletion der GAP-Domäne (*bem2 Δ gap*) gezeigt werden, dass der beobachtete Phänotyp auf den Verlust der GAP-Funktion zurückzuführen ist (Abb. 2.11 D). Die kombinierten Mutationen von *rip1/bem3* und *rip1/bem3/bem2* führten nur zu einer leichten zusätzlichen Verlängerung der Zellen im Vergleich zu den Einzeldepletionen (Abb. 2.11 D und E). Die Überexpression der Rac1-GAPs führte

2 Ergebnisse

ebenfalls zu einer gestörten Zellmorphologie, verbunden mit deutlichen Elongationen. Dabei war die beobachtete Zellverlängerung im Falle von Bem2 am stärksten und im Falle von Bem3 am schwächsten ausgeprägt (Abb. 2.11 F).

Sowohl durch Depletion, als auch bei Überexpression hatten Rip1, Bem2 und Bem3 Einfluss auf die Polarisierung der Zellen. Daraus kann gefolgert werden, dass sie an der Regulation des polaren Wachstums beteiligt sind. In Zusammenarbeit mit Björn Sandrock und Annette Bauer wurde die Lokalisation der potentiellen Rac1-GAPs überprüft. Dazu wurde GFP-Rip1 in $\Delta rip1$ Zellen und GFP-Bem3 in einer $\Delta bem3$ Mutante konstitutiv exprimiert. Bem2 wurde am genomischen Ort C-terminal an GFP fusioniert und unter der Kontrolle des *tef* Promotors überexprimiert. GFP-Rip1 zeigte Akkumulationen an der Spitze kleiner Knospen (Abb. 2.12). GFP-Bem3 aggregierte schon vor der Knospung an der Zellspitze, war aber auch an den Spitzen kleiner und großer Knospen zu finden. Bem2-GFP zeigte eine sehr schwache Lokalisation an der Zellmembran und an Endomembranen (Abb. 2.12).

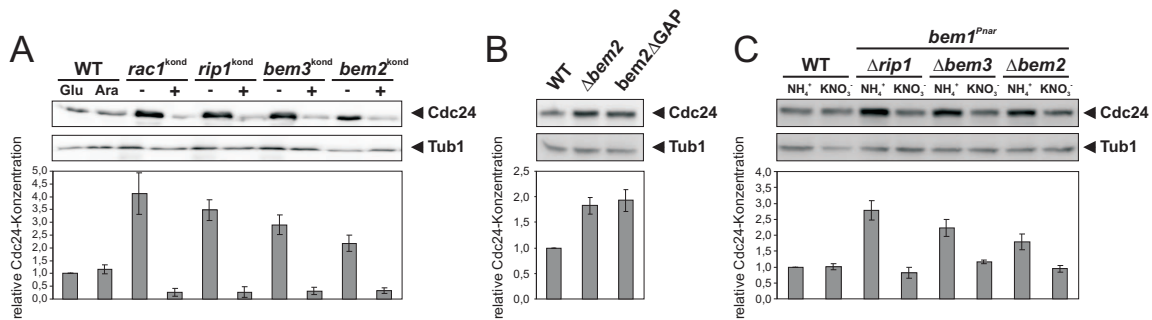


Abbildung 2.13: Die Deletion der Rac1-GAPs hat eine Bem1-abhängige stabilisierende Wirkung auf die Cdc24 Konzentration. **A)** Vergleich der Auswirkungen der Depletion (-) und Überexpression (+) von Rac1, Rip1, Bem3 und Bem2 auf die Menge an Cdc24. Cdc24 wurde in konditionalen Mutanten von *rac1*, *rip1*, *bem3* und *bem2*, die das entsprechende Gen unter der Kontrolle des *crg* Promotors exprimierten, am genomischen locus mit 3xHA markiert. Die Stämme wurden in Glukose (-) und Arabinose (+) haltigem Flüssigmedium angezogen. Die Graphik zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichung dreier unabhängiger Versuche. **B)** Vergleich der Cdc24-3xHA Menge in Wildtyp Zellen, in *bem2* Deletions- und in *bem2* Δ GAP Mutanten. Mittelwerte und Standardabweichung von drei Versuchen sind gezeigt. **C)** Auswirkungen eines erhöhten Bem1 Niveaus auf den stabilisierenden Effekt der Depletionen von *rip1*, *bem3* und *bem2*. Bem1 wurde ektopisch unter der Kontrolle des nitratinduzierbaren *nar* Promotors in den GAP Mutanten exprimiert. Die Kulturen wurden in ammoniumhaltigem (NH₄⁺) Flüssigmedium angezogen und in nitrathaltigem (KNO₃⁻) für sechs Stunden induziert. Die Graphik zeigt Mittelwert und Standardabweichung von drei Experimenten.

Um zu überprüfen, ob der beobachtete Effekt der GAP Depletionen und Überexpressionen auf die Zellpolarität sich auch auf die Cdc24 Proteinstabilität auswirkt, wurde Cdc24-3xHA unter der Kontrolle des endogenen Promotors in konditionalen *rip1*, *bem3* und *bem2* Mutanten exprimiert. Depletion der Rac1-GAPs hatte einen deutlichen positiven Effekt auf die Cdc24 Proteinstabilität (Abb. 2.13 A). Dabei war das Cdc24-3xHA

Niveau im Vergleich zum Wildtyp in Abwesenheit von Rip1 bis auf über dreihundert Prozent erhöht, wohingegen es in Abwesenheit von Bem3 und Bem2 nur auf einen Wert von über zweihundert Prozent, bzw. über hundertfünfzig Prozent erhöht war (Abb. 2.13 A). Der stabilisierende Effekt der Bem2 Depletion rührte von der Abwesenheit seiner GAP-Funktion her (Abb. 2.13 B). Interessanterweise konnte das durch die Depletion der GAPs stabilisierte Cdc24-3xHA Niveau durch die gleichzeitige ektopische Überexpression von Bem1 (Abb. 2.13 C), nicht jedoch durch die von Rac1 (nicht gezeigt), wieder abgesenkt werden. Die Überexpressionen der Rac1-GAPs führten zu einer starken Destabilisierung von Cdc24-3xHA, die mit der durch eine Rac1 Überexpression induzierten Degradation des GEFs vergleichbar war (Abb. 2.13 A).

2.2.2 Der Guanin-Nukleotid Dissoziations Inhibitor Rdi1 stellt inaktives Rac1-GDP zur erneuten Aktivierung zu Verfügung

Es ist anzunehmen, dass nach einer GAP-stimulierten Inaktivierung von Rac1 durch GTP-Hydrolyse, der Rac1/Bem1/Cla4 Komplex zerfällt, da weder Bem1 noch Cla4 Affinität zu Rac1-GDP besitzt (Abb. 2.3 D). Das freigesetzte Rac1-GDP verbleibt vermutlich zunächst an der Membran. Um die GTPase während des polaren Wachstums einer erneuten Aktivierung zuzuführen, muss sie an die Spitze zurückgebracht werden. Dies kann durch Interaktion mit einem Guanin-Nukleotid Dissoziations Inhibitor (GDI) sichergestellt werden, der die GTPase durch eine hydrophobe Interaktion mit dem Prenylanker von der Membran ablöst (Sasaki et al., 1990; Wu et al., 1996b; Seabra and Wasmeier, 2004). Die Deletion des *U. maydis* Homologes des GDI Rdi1 hatte keine Auswirkungen auf das Erscheinungsbild haploider Zellen. Sowohl die Knospung, als auch die Septenbildung waren ungestört (Abb. 2.14 A). Diese Beobachtung war mit früheren Ergebnissen konsistent (Andrea Hlubek, Dissertation). Eine N-terminale GFP-Fusion des GDIs, die in $\Delta rdi1$ Zellen ektopisch konstitutiv exprimiert wurde, lokalisierte im Zytoplasma und an Endomembranen (Abb. 2.14 D). Um die Auswirkungen eines erhöhten Rdi1 Niveaus zu untersuchen, wurde eine konditionale Mutante hergestellt, in der *rdi1* unter der Kontrolle des starken induzierbaren *crg* Promotors stand. Interessanterweise führte die Überexpression von Rdi1 zu einer sehr starken Zellverlängerung (Abb. 2.14 B und C). Um die Bedeutung von Rdi1 für das *b*-induzierte filamentöse Wachstum zu untersuchen, wurde *rdi1* in dem Stamm AB31 deletiert. AB31 $\Delta rdi1$ zeigte eine verzögerte Filamentbildung. Drei Stunden nach Induktion der bW2/bE1 Überexpression, wenn mehr als achtzig Prozent der Wildtypzellen bereits ein Filament ausgebildet hatten, zeigte höchstens die Hälfte der $\Delta rdi1$ Zellen eine deutlich kürzere filamentöse Struktur (Abb. 2.14 E und F). Nach längerer b-Induktion waren jedoch nahezu alle AB31 $\Delta rdi1$ Zellen in der Lage, ein Filament auszubilden, dass im Aufbau mit denen

2 Ergebnisse

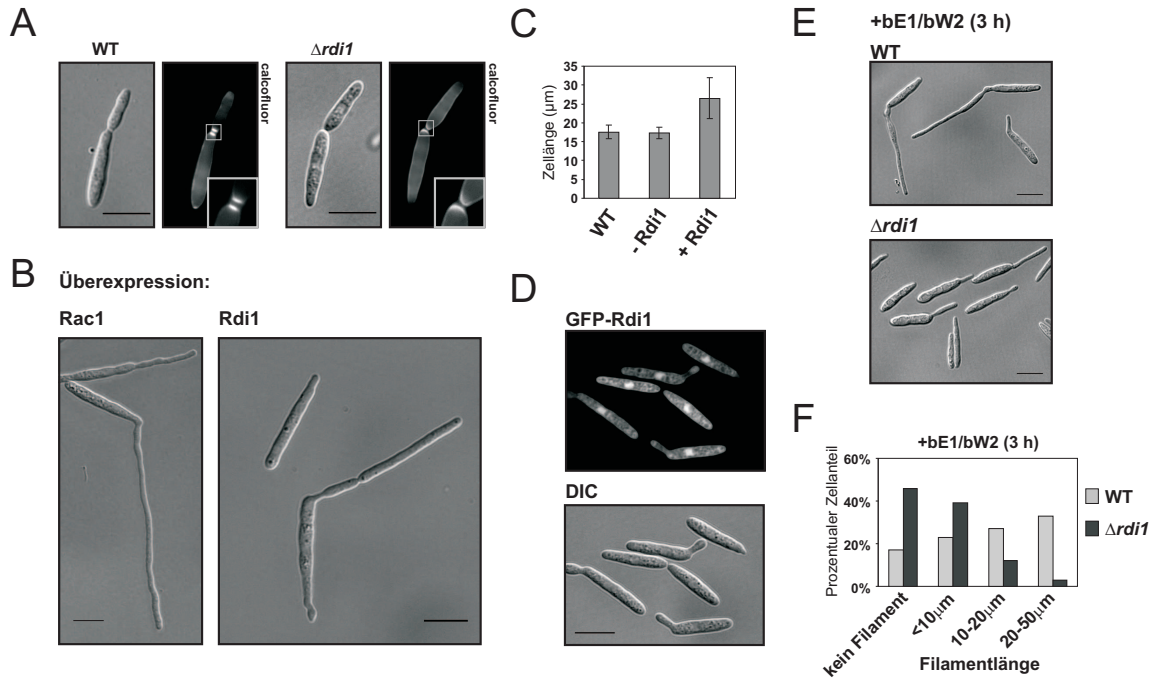


Abbildung 2.14: Rdi1 ist ein Regulator der Zellpolarität in *U. maydis*. **A)** Phänotyp von *rdi1* Deletionsmutanten. Die Zellwände wurden mit Calcofluor-Weiss angefärbt. Knospende Zellen weisen ein charakteristisches Doppelseptum zwischen Mutter- und Tochterzelle auf. Der Größenstandard repräsentiert 10 μm . **B)** Erscheinungsbild von Zellen, die Rac1 oder Rdi1 überexprimieren. Die Zellen wurden für acht Stunden in induzierendem Flüssigmedium inkubiert. Der Größenstandard entspricht 10 μm . **C)** Quantifizierung ($n=50$) der Zelllänge bei Rdi1 Depletion (-Rdi1) und Überexpression (+Rdi1). Die Standardabweichung ist durch die Balken angezeigt. **D)** Lokalisation einer N-terminalen GFP-Fusion von Rdi1 in $\Delta rdi1$ Mutanten. **E)** Phänotyp von AB31 und AB31 $\Delta rdi1$ Zellen drei Stunden nach der Induktion der bW2/bE1 Überexpression. Der Größenstandard entspricht 10 μm . **F)** Quantifizierung ($n=150$) des prozentualen Anteils der Zellen ohne Filament und mit Filamenten der angegebenen Längen (unter 10 μm , zwischen 10 und 20 μm , zwischen 20 und 50 μm und über 50 μm) drei Stunden nach der Induktion der bW2/bE1 Überexpression im Wildtyp und in der AB31 $\Delta rdi1$ Mutante.

von AB31 vergleichbar (nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, ob Rdi1 in *U. maydis* mit GTPasen interagiert und sie aus der Membran herauslösen kann, wurden N-terminale GFP-Fusionen von Rac1 und dem nah verwandten Cdc42 in der konditionalen *rdi1* Mutante exprimiert. In Wildtypzellen zeigten GFP-Rac1 und GFP-Cdc42 eine starke Lokalisation an der gesamten Zellmembran und an den Septen. GFP-Rac1 zeigte zusätzlich eine Akkumulation an der Knospenspitze, wohingegen GFP-Cdc42 auch an Endomembranen lokalisierte (Abb. 2.15 A und C). Im Falle einer Rdi1 Depletion war die Membranlokalisierung der GTPasen nicht gestört. Im Fall von Cdc42 kam es jedoch zu zusätzlichen Akkumulationen im Zytoplasma (Abb. 2.15 C). Die Überexpression von Rdi1 führte hingegen zur Aufhebung der Membranlokalisierung, wobei hier der Effekt für GFP-Rac1 deutlich größer war (Abb. 2.15 A und C). Für das Säugetier Ortholog von Rdi1, GDI1, wurde eine GTPasen stabilisierende Funktion beschrieben (Boulter et al., 2010). Folglich wurden

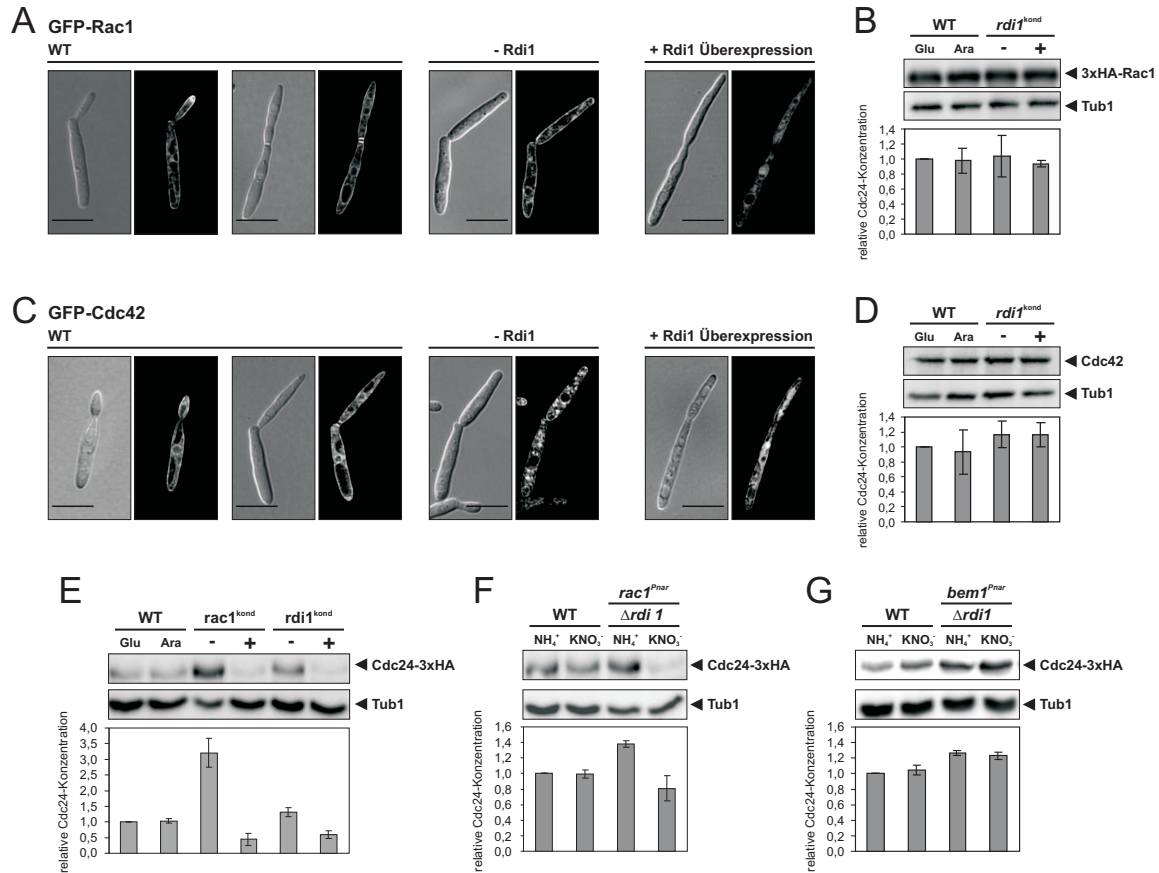


Abbildung 2.15: Rdi1 hat einen Rac1-abhängigen Einfluss auf die Stabilität von Cdc24.

A) Lokalisation einer konstitutiv exprimierten N-terminalen GFP-Fusion von Rac1 in wildtyp Zellen und in einer konditionalen *rdi1* Mutante, in der das *rdi1* Gen an seinem Locus unter der Kontrolle des *crg* Promotors stand. Die Zellen wurden über Nacht in glukosehaltigem Flüssigmedium angezogen (-Rdi1) und dann für vier Stunden in arabinosehaltigem Medium inkubiert (+Rdi1). Der Größenstandard entspricht 10 μ m. **B)** Quantifizierung der Menge an endogen exprimiertem 3xHA-Rac1 in Abwesenheit von Rdi1 (-) und bei Überexpression des GDIs (+). Das Diagramm zeigt den Mittelwert dreier unabhängiger Versuche. Die Balken zeigen die Standardabweichung. **C)** Lokalisation von konstitutiv exprimiertem GFP-Cdc42 in der konditionalen *rdi1* Mutante. Die Anzucht der Kulturen erfolgte wie in (A) beschrieben. Der Größenstandard repräsentiert 10 μ m. **D)** Die Quantifizierung der Menge an endogenem Cdc42 erfolgte wie in (B) beschrieben. **E)** Vergleich der Auswirkungen der Depletion und Überexpression von Rac1 und Rdi1 auf das endogene Cdc24-3xHA Niveau. Die konditionalen *rac1* und *rdi1* Mutanten wurden auf Glukose (-) und Arabinose (+) angezogen. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen dreier Experimente. **F)** Effekt der Bem1 Überexpression unter Kontrolle des *nar* Promotors auf die Cdc24 stabilisierende Wirkung der *rdi1* Depletion. Die Kulturen wurden in ammoniumhaltigem (NH₄⁺) Flüssigmedium angezogen und in nitrathaltigem (KNO₃⁻) für sechs Stunden induziert. Der aus drei Experimenten erhobene Mittelwert und die Standardabweichung sind gezeigt. **G)** Auswirkungen der Überexpression von Rac1 unter der Kontrolle des *nar* Promotors auf die stabilisierende Wirkung der *rdi1* Deletion. Die Expressionsbedingungen sind in (F) beschrieben. Das Diagramm zeigt den Mittelwert von drei Experimenten und die Standardabweichung.

auch die Auswirkungen der Rdi1 Depletion und Überexpression auf die Menge an endogen exprimiertem 3xHA-Rac1 und Cdc42 untersucht. Die Menge beider GTPasen blieb jedoch sowohl bei Überexpression, als auch bei Depletion von Rdi1 nahezu unbeeinflusst (Abb. 2.15 B und D). Da Rdi1 in der Lage ist, Rac1 aus der Membran zu lösen, bei Überexpression Zellen zu hyperpolarisieren und die Anwesenheit von Rdi1 eine Voraussetzung für die zügige Filamentinduktion ist, wurde der Einfluss des GDI auf die Regulation von Cdc24 untersucht. Dazu wurde Cdc24 in der konditionalen *rdi1* Mutante am genomischen Ort mit einem dreifachen HA-Epitop markiert. Die Depletion von Rdi1 hatte nur eine vergleichsweise geringe Auswirkungen auf die Proteinstabilität von Cdc24-3xHA (Abb. 2.15 E). Interessanterweise war der stabilisierende Effekt einer Depletion von Rdi1 durch die Überexpression von Rac1 aufhebbar (Abb. 2.15 F), nicht jedoch durch die von Bem1 (Abb. 2.15 G). Die Überexpression des GDI hatte eine, mit der von Rac1 vergleichbare, deutliche destabilisierende Wirkung auf die Cdc24-3xHA Menge (Abb. 2.15 E).

2.2.3 Das Entfernen von Rac1-GDP aus der Membran wird durch die aktinabhängige Endozytose während des polaren Wachstums unterstützt

Die Tatsache, dass $\Delta rdi1$ Mutanten nur geringe Polaritätsdefekte zeigen, weist darauf hin, dass es zusätzliche Mechanismen geben muss, die die Entfernung von inaktivem Rac1-GDP aus der Membran sicherstellen, damit es anschließend einer neuen Aktivierung zugeführt werden kann. Es ist bekannt, dass in *S. cerevisia* die aktinvermittelte Endozytose für die Funktion von Cdc42 eine wichtige Rolle spielt (Slaughter et al., 2009). Um die Bedeutung der Endozytose für die Rac1-abhängige Regulation von Cdc24 zu untersuchen, wurde der endozytotische Prozess auf zwei Arten inhibiert. Zum einen wurde die temperatursensitive Mutation in dem endosomalen t-SNARE *Yup1^{ts}* genutzt (Wedlich-Söldner et al., 2000). Zum anderen wurden die Zellen mit LatrunculinA (50 μ M) inkubiert, um das Aktinzytoskelett zu zerstören. Die Inhibition der Endozytose führte in beiden Fällen zu einer Verdickung der Zellen und einer irregulären Septierung (Abb. 2.16 A und C). Sowohl die Inkubation der *Yup1^{ts}* Mutante bei nichtpermissiver Temperatur, als auch die Inkubation der Zellen mit LatrunculinA, resultierte in einer leichten Stabilisierung des Cdc24-3xHA Niveaus auf etwa hundertvierzig Prozent (Abb. 2.16 B und D). Die Inhibition der Endozytose führte in $\Delta rdi1$ Zellen zu einem Anstieg der Cdc24-3xHA Konzentration auf hundertachzig Prozent (Abb. 2.16 F), was darauf hindeutet, dass der stabilisierende Effekt der Inhibition der Endozytose und der stabilisierende Effekt der *rdi1* Deletion additiv wirken.

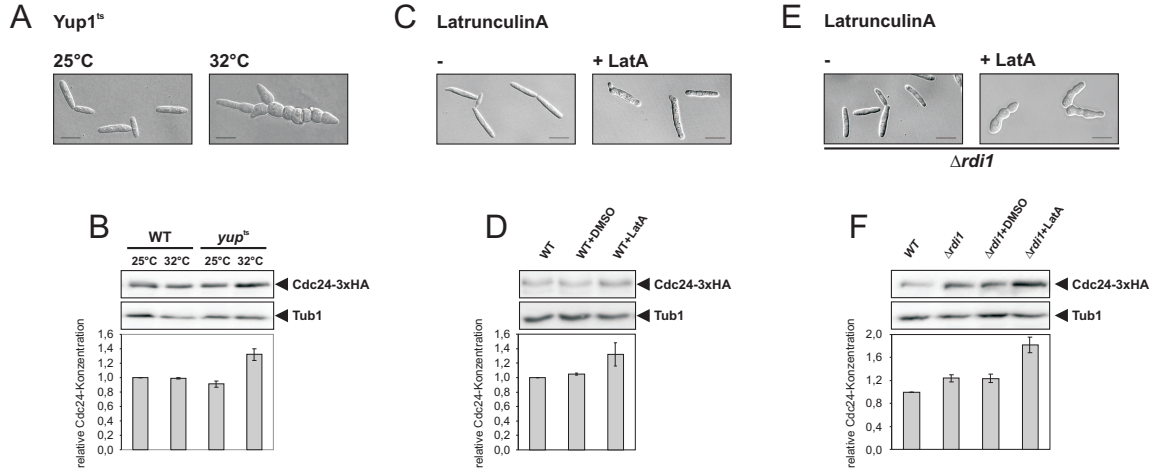


Abbildung 2.16: Die Inhibition der aktinabhängigen Endozytose hat einen stabilisierenden Effekt auf die Cdc24 Konzentration. **A)** Phänotyp von Zellen nach vierstündiger Inhibition der temperatursensitiven Mutante des endosomalen t-SNARE *Yup1*. Der Größenstandard entspricht 10 μm . **B)** Quantifizierung der Menge an endogenem Cdc24-3xHA vor (25°C) und nach (32°C) der Inhibition von *Yup1^{ts}*. Das Diagramm zeigt den Mittelwert dreier Experimente. Der Balken repräsentiert die Standardabweichung. **C)** Erscheinungsbild von Zellen nach vierstündiger Inkubation mit LatrunculinA (LatA). Der Längenstandard entspricht 10 μm . **D)** Bestimmung der Menge an endogenem Cdc24-3xHA vor (WT und WT + DMSO) und vier Stunden nach der Zugabe des Inhibitors (+LatA). Der Mittelwert dreier Experimente ist mit Standardabweichung gezeigt. **E)** Phänotyp von *Δrdi1* Zellen vor (-) und nach Inkubation mit LatA. Der Größenstandard zeigt 10 μm . **F)** Vergleich des endogenen Cdc24-3xHA Niveaus im Wildtyp, in *Δrdi1* Zellen, in *Δrdi1* Zellen, die mit dem Lösungsmittel von LatA (DMSO) inkubiert wurden und in *Δrdi1* Zellen, die mit LatA behandelt wurden. Mittelwert und Standardabweichung von drei Experimenten sind in der Graphik gezeigt.

2.2.4 Rac1 muss GTP hydrolysieren und mit Rdi1 interagieren können, um das polare Wachstum zu stimulieren

Während des polaren Wachstums muss Rac1-GTP durch Rip1, Bem2 und Bem3 inaktiviert und durch Rdi1, bzw durch Endozytose einer neuen Aktivierung an der Spitze zugeführt werden. Um die Bedeutung der einzelnen Schritte für das polare Spitzenwachstum beurteilen zu können, wurden die Interaktionen von Rac1 mit anderen Regulatoren einzeln und in Kombination aufgehoben. Dies wurde durch die Einführung von spezifischen Punktmutationen erreicht. Die entsprechenden Rac1 Varianten wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, filamentöses Wachstum zu induzieren und die Cdc24 Proteinstabilität negativ zu regulieren. Die Fähigkeit von Rac1 mit den GAP-Domänen von Rip1, Bem2 und Bem3 zu interagieren, wurde durch die Einführung der EN91/92HH Mutationen (Rittinger et al., 1997a; Wu et al., 2009) aufgehoben (Abb. 2.11 C). Die Überexpression von Rac1^{EN91/92HH} war zwar ausreichend, um polares Wachstum zu induzieren, die Zellen zeigten jedoch eine irreguläre, vielfach verdickte Form (Abb. 2.17 A). Die Interaktion mit Rdi1 wurde durch die Einführung der Mutation R66E verhindert (Gibson and Wilson-Delfosse, 2001). GFP-Rac1^{R66E} verblieb auch bei starker Überex-

2 Ergebnisse

pression von Rdi1 an der Membran (nicht gezeigt). Die Überexpression von Rac1^{R66E} war ausreichend um Filamente zu induzieren und hatte keine weiteren Auswirkungen auf die Zellmorphologie (Abb. 2.17 A). Die destabilisierende Auswirkung des erhöhten Rac1 Niveaus auf die Cdc24 Proteinkonzentration wurde sowohl durch die Unterbindung der Interaktion mit GAPs (Rac1^{EN91/92HH}), als auch durch Verhinderung der Bindung von Rdi1 (Rac1^{R66E}) signifikant abgeschwächt. Bei Überexpression von Wildtyp Rac1 fiel das Cdc24 Niveau auf zehn Prozent ab, bei Rac1^{EN91/92HH} Überexpression nur auf fünfzig Prozent und bei der Überexpression von Rac1^{R66E} auf sechzig Prozent (Abb. 2.17 B). Ein vergleichbarer Cdc24 stabilisierender Effekt konnte durch die Einführung der F28L Mutation (Lin et al., 1997) erzielt werden, die zu einer Abschwächung der Affinität der GTPase zum gebundenen Nukleotid führt. Dadurch entsteht eine sogenannte

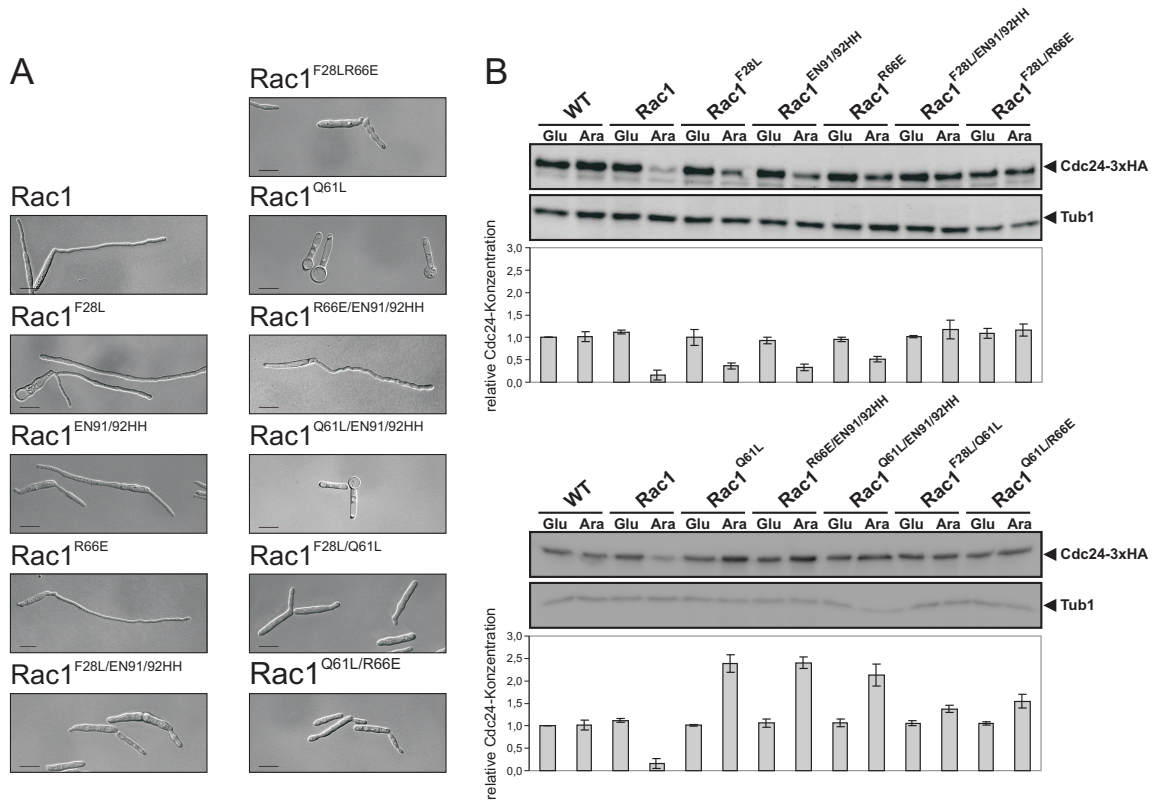


Abbildung 2.17: Rac1 muss seine GDP-gebundene Konformation durchlaufen und mit Rdi1 interagieren können, um Cdc24 zu destabilisieren. A) Phänotyp von Zellen, die Rac1 Varianten überexprimieren, die in ihrer Rezyklisierung beeinträchtigt sind. F28L bewirkt eine schwächere Bindung des Nukleotids in der Bindetasche, Q61L führt zu einer konstitutiv aktiven Konformation, EN91/92HH verhindert die Bindung von GAPs und R66E unterbindet die Interaktion mit Rdi1. Der Längenstandard zeigt 10 μ m. B) Effekt der Überexpressionen der angezeigten Rac1 Mutanten auf das endogene Cdc24-3xHA Niveau. Die Rac1 Varianten wurden ektopisch unter der Kontrolle des *crg* Promotors exprimiert. Die Kulturen wurden auf Glukose angezogen und anschließend acht Stunden in arabinosehaltigem Medium induziert. Die Mittelwerte und die Standardabweichung dreier Messungen sind in den Diagrammen dargestellt.

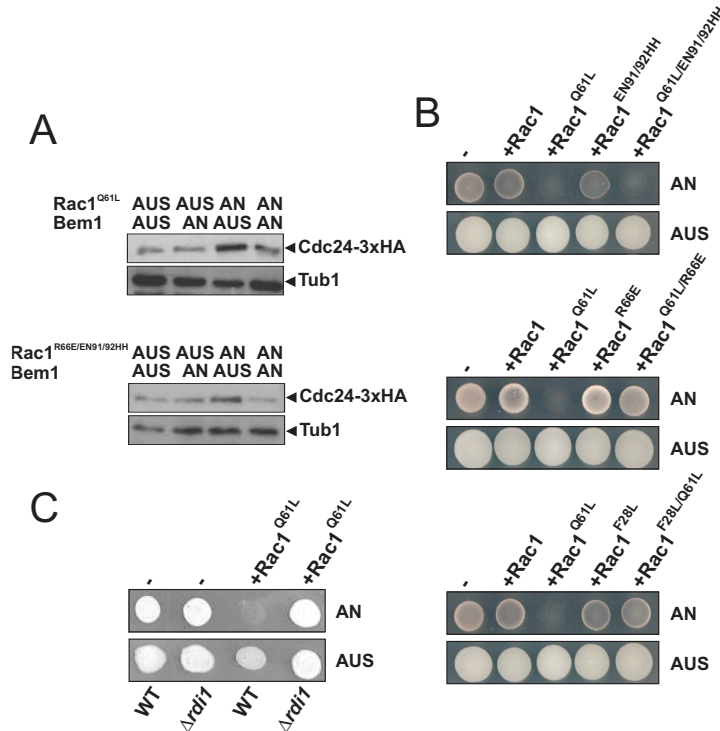


Abbildung 2.18: Rac1^{Q61L} benötigt die Interaktion mit Rdi1 und Bem1, um seine Wirkung zu entfalten. **A)** Überprüfung der Auswirkungen der Überexpression von Rac1^{Q61L} und Rac1^{R66E/EN91/92HH} auf das Cdc24 Niveau, bei gleichzeitiger schwacher Überexpression von Bem1. Rac1^{Q61L} und Rac1^{R66E/EN91/92HH} wurden unter der Kontrolle des starken induzierbaren *crg* Promotors (Glukose = AUS, Arabinose = AN) exprimiert. Bem1 stand unter der Kontrolle des schwächeren induzierbaren *nar* Promotors (Ammonium = AUS, Nitrat = AN). Die Kulturen wurden über Nacht auf Glukose und Ammonium angezogen und die Zellen anschließend für acht Stunden in induzierendes Medium (Glukose + Nitrat, Arabinose + Ammonium, Arabinose + Nitrat) überführt. **B)** Untersuchung der Lebensfähigkeit haploider *U. maydis* Zellen bei Überexpression mutierter Varianten von Rac1. Rac1^{Q61L} wurde mit der R66E (keine Rdi1 Bindung), der F28L (lockere Nukleotidbindung) und der EN91/92HH (keine GAP Interaktion) Mutation kombiniert. Unter nichtinduzierenden Bedingungen angezogene Flüssigkulturen (OD₆₀₀ 0,5) wurden auf Glukose haltiges (AUS) und Arabinose haltiges (AN) Festmedium getropft und einen Tag inkubiert. **C)** Überprüfung der Lebensfähigkeit von $\Delta rdi1$ Mutanten bei Überexpression von Rac1^{Q61L}. Die Anzucht erfolgte wie in (A) beschrieben.

„Fast-Cycling“ GTPase, die durch den spontanen Nukleotidverlust GAP-unabhängig inaktivierbar und durch die anschließende Inkorporation von GTP GEF-unabhängig aktivierbar ist. Die Überexpression von Rac1^{F28L} war ausreichend, um Filamente zu induzieren, senkte aber das Cdc24 Niveau nur auf fünfzig Prozent ab (Abb. 2.17 A und B). Die Überexpression der kombinierten Mutanten Rac1^{F28L/R66E} und Rac1^{F28L/EN91/92HH} führte weder zur Filamentinduktion, noch zum Abbau von Cdc24, was für einen additiven Effekt der Mutationen spricht. Interessanterweise hatte die Überexpression der kombinierten Mutante Rac1^{R66E/EN91/92HH} einen deutlichen stabilisierenden Effekt auf die Cdc24 Menge. Die Konzentration des GEFs stieg auf über zweihundert Prozent an (Abb. 2.17 B). Dieser positive Effekt auf die Cdc24 Proteininstabilität war mit dem der

Überexpression von konstitutiv aktivem Rac1^{Q61L} vergleichbar (Abb. 2.17 B). Da sowohl Rac1^{Q61L} als auch Rac1^{R66E/EN91/92HH} nach der Interaktion mit Bem1 vermutlich dauerhaft im Komplex mit dem Gerüstprotein verbleiben, wurde überprüft, ob ein erhöhtes Niveau von Bem1 die Cdc24 stabilisierende Wirkung dieser Rac1 Varianten aufheben kann. Die Cdc24 stabilisierende Wirkung von Rac1^{Q61L} und Rac1^{R66E/EN91/92HH} konnte durch gleichzeitige schwache Überexpression von Bem1 wieder aufgehoben werden (Abb. 2.18 A). Die Einflüsse der Überexpression von Rac1^{R66E/EN91/92HH} und Rac1^{Q61L} auf den Phänotyp der Zellen waren jedoch unterschiedlich. Während die Überexpression von Rac1^{R66E/EN91/92HH} ausreichend war um Filamente zu induzieren, die jedoch eine gestörte wellenförmige Struktur hatten, führte die Überexpression von Rac1^{Q61L} zum Aufblähen der Zellen durch Ausbildung einer großen Vakuole und zum Zelltod durch Zerplatzen (Mahlert et al., 2006) (Abb. 2.17 B). Sowohl die Cdc24 stabilisierende, als auch die lethale Wirkung der Rac1^{Q61L} Mutation wurden durch die Einführung der EN91/92HH Mutation (keine GAP Interaktion) nicht beeinflusst (Abb. 2.17 B und 2.18 B). Die Überexpression von Rac1^{F28L/Q61L} und Rac1^{Q61L/R66E} führten jedoch nicht mehr zum Zelltod und die Cdc24 Proteinkonzentration stieg nur geringfügig über hundert Prozent an (Abb. 2.17 B) und 2.18 B). Beide Rac1 Varianten waren in ihrer Fähigkeit Bem1 und Cla4 zu präzipitieren nicht beeinträchtigt und konnten daher als funktional angesehen werden (nicht gezeigt). Die Überexpression von Rac1^{Q61L} war in $\Delta rdi1$ Mutanten nicht tödlich (Abb. 2.18 C). Dies bestätigt, dass Rac1^{Q61L} die Interaktion mit Rdi1 benötigt, um seine lethale Wirkung zu entfalten.

2.3 Die selektive Aktivierung durch Cdc24 bestimmt die Rac1-Signalspezifität

2.3.1 Rac1 und Cdc42 haben in *U. maydis* spezifische und redundante Funktionen

In *U. maydis* reguliert Rac1 das polare Wachstum während der Knospung und des filamentösen Wachstums, wohingegen das nah verwandte Cdc42 die Bildung des sekundären Septums während der Zellteilung haploider Zellen und die Ausbildung der Septen am distalen Ende des Filaments reguliert (Mahlert et al., 2006; Hlubek et al., 2008; Schink and Bölker, 2009; Freitag et al., 2011). Die Aktivierung von Cdc42 erfolgt dabei durch den endosomal lokalisierten Rho-GEF Don1 (Hlubek et al., 2008; Schink and Bölker, 2009). Rac1 wird hingegen, wie schon in den vorherigen Abschnitten beschrieben, durch Cdc24 aktiviert. Beide GEFs wurden von Kay Schink *in vitro* auf ihre Spezifität hin überprüft. Für dieses Experiment wurde die katalytische DH-PH Tandem Domäne der GEFs und die zu testenden GTPasen als GST-Fusionsproteine in *E. coli*

2 Ergebnisse

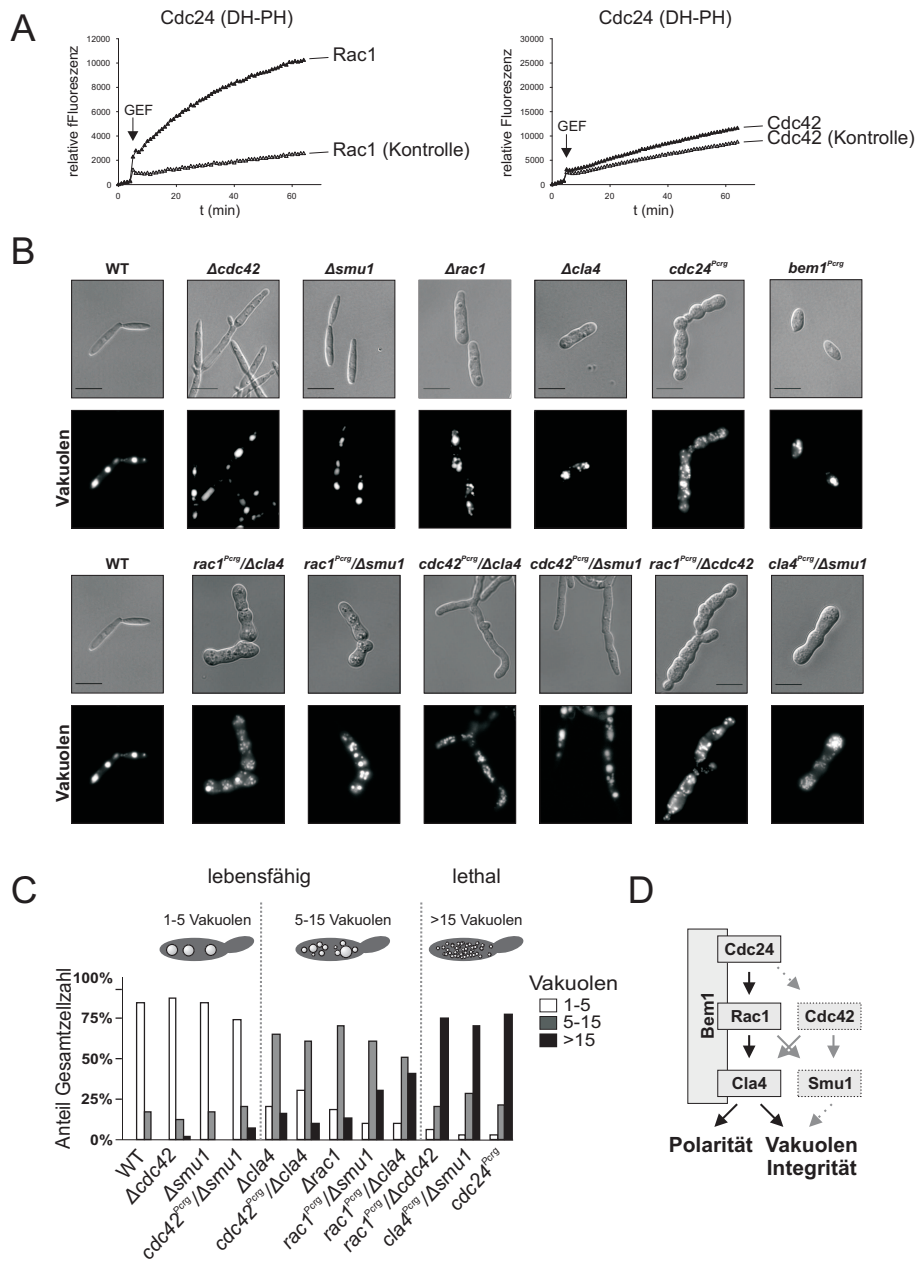


Abbildung 2.19: Cdc24 aktiviert Rac1 und Cdc42 *in vitro* und *in vivo*, Rac1 jedoch mit höherer Präferenz. **A)** *in vitro* Aktivierungsnachweis von Cdc24 in Kombination mit Rac1 und Cdc42 (Die „GEF-assays“ wurden von Kay Schink zur Verfügung gestellt). Der Graph zeigt die Mittelwerte dreier Experimente. Die Fluoreszenz ist in relativen Einheiten angegeben. **B)** Phänotyp von *cdc24*, *rac1*, *cdc42*, *cla4*, *smu1* und *bem1* Mutanten. Konditionale Mutanten werden durch das Kürzel *Prg* angezeigt und wurden unter repressiven Bedingungen für vierundzwanzig Stunden inkubiert. Die Vakuolen wurden bei OD₆₀₀ 0,5 mit dem fluoreszierenden Farbstoff „CellTracker blue“ (Molecular probes) angefärbt. Der Größenstandard entspricht 10 μ m. **C)** Quantifizierung (n=50) der Vakuolen pro Zelle in den in (B) gezeigten Stämmen. Der prozentuale Anteil von Zellen mit bis zu fünf, zwischen sechs und fünfzehn und mit mehr als sechzehn Vakuolen an der Gesamtzellpopulation wurde graphisch dargestellt. **D)** Schematisches Modell der Protein-Protein Interaktionen in dem Cdc24-induzierten essentiellen Signalweg, der die Integrität der Vakuolen kontrolliert.

2 Ergebnisse

überexprimiert und anschließend über Affinitäts-Chromatographie gereinigt. Die GEF Aktivität der Austauschfaktoren für Rac1 und Cdc42 wurde über die katalysierte Inkorporation von fluoreszierendem mant-GDP im Fluorimeter gemessen. Während Don1 ausschließlich Katalyseaktivität für Cdc42 zeigte (Hlubek et al., 2008), hatte Cdc24 eine starke Affinität für Rac1, zeigte aber auch eine schwache GEF-Aktivität gegenüber Cdc42 (Abb. 2.19 A).

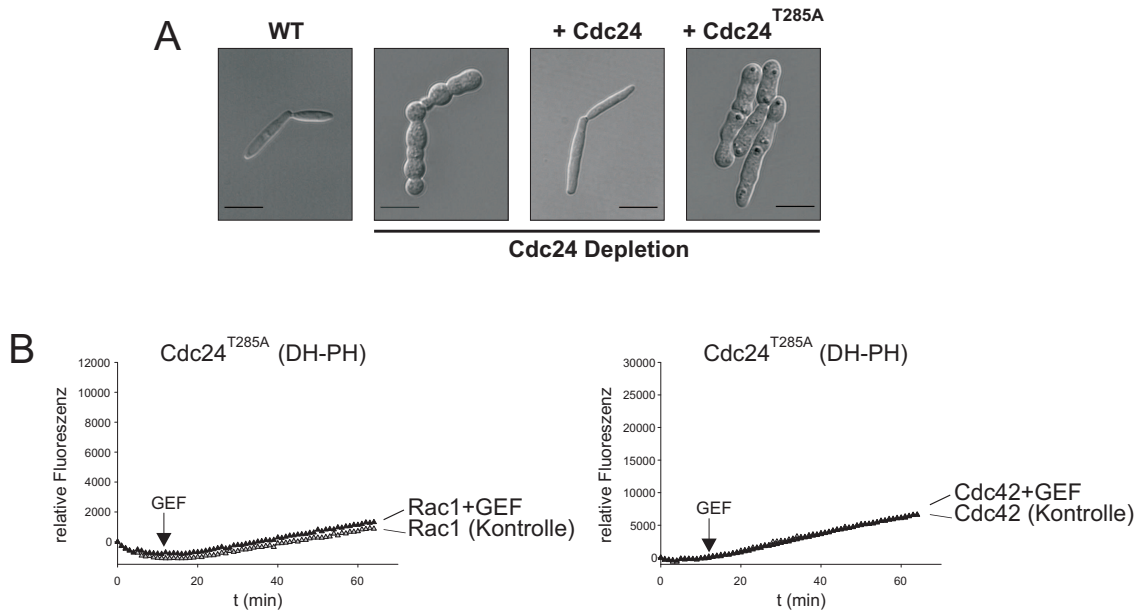


Abbildung 2.20: Die essentielle Funktion von Cdc24 hängt von seiner GEF Aktivität ab. **A)** Erscheinungsbild konditionaler *cdc24* Mutanten, die unter repressiven Bedingungen angezogen wurden und entweder Cdc24 oder Cdc24^{T285A} unter der Kontrolle des konstitutiven *tef* Promotors ektopisch exprimierten. Der Balken repräsentiert 10 μ m. **B)** *in vitro* Aktivitätstest mit GST-Cdc24^{T285A}_{DH-PH}. Gemessen wurde die GEF-stimulierte Inkorporation von mant-GDP in GST-Rac1 und GST-Cdc42. (Der „GEF-assay“ wurde von Britta Tillmann durchgeführt)

Der GEF Cdc24 ist in *U. maydis* ein essentielles Protein (Andrea Hlubek, Dissertation), wohingegen weder sein präferiertes Substrat Rac1, noch das nah verwandte Cdc42 essentiell sind (Mahlert et al., 2006). Zellen, in denen Cdc24 depletiert wurde, stellten das Wachstum ein und verendeten als stark vergrößerte multiseptierte Zellen, die eine starke Fragmentierung der Vakuolen aufwiesen (Abb. 2.19 B und C). Zellen, in denen *rac1* deletiert ist, zeigten im Vergleich dazu nur eine schwache Fragmentierung der Vakuolen und $\Delta cdc42$ Zellen wiesen wildtypische Vakuolen auf. Der Phänotyp einer Cdc42/Rac1 Doppeldepletion ist hingegen mit dem der Cdc24 Depletion vergleichbar (Abb. 2.19 B und C). Daraus kann abgeleitet werden, dass die Fähigkeit von Cdc24 neben Rac1 auch Cdc42 zu aktivieren für das Überleben von $\Delta rac1$ Mutanten kritisch ist. Um dies zu überprüfen, wurde eine zum Verlust der GEF Aktivität führende Punktmutation (Aghazadeh et al., 1998) in die katalytische DH Domäne von Cdc24 eingeführt. Der

2 Ergebnisse

mutierte GEF Cdc24^{T285A} war nicht in der Lage den lethalen Phänotyp einer konditionalen *cdc24* Mutante unter repressiven Bedingungen zu retten (Abb. 2.20 A). Dies war eindeutig auf den Verlust der GEF Aktivität zurückzuführen, da die mutierte katalytische Domäne von Cdc24^{T285A} in einem von Britta Tillmann durchgeführten *in vitro* „GEF-assay“ nicht mehr in der Lage war, den Nukleotidaustausch an GST-Rac1 und GST-Cdc42 zu katalysieren (Abb. 2.20 B).

Rac1 reguliert das polare Wachstum, wie bereits in Abschnitt 2.1.5 erläutert, vermutlich durch die Stimulation von Cla4. Zellen, die eine *cla4* Deletion tragen, weisen eine mit der von $\Delta rac1$ Zellen vergleichbare schwache Vakuolenfragmentierung auf (Abb. 2.19 B und C). Wenn die Hypothese zutrifft, dass Cdc42 Rac1 partiell ersetzen kann, so muss es auch in der Lage sein, Cla4 oder eine andere redundante Kinase zu stimulieren. Die Depletion von Cla4 führte in Zellen, die eine Deletion des Genes *smu1* trugen, das für ein Homolog der mit Cla4 nah verwandten Kinase Ste20 kodiert (der Stamm wurde mir von Johannes Freitag zur Verfügung gestellt), zur Vakuolenfragmentierung. Dieser Phänotyp war mit dem der Cdc24 Depletion vergleichbar (Abb. 2.19 B und C). Dies deutet darauf hin, dass die PAK Kinase Smu1 eine essentielle Funktion mit Cla4 teilt, ebenso wie Cdc42 mit Rac1. Um die Interaktionen zwischen den Rac1/Cla4 und Cdc42/Smu1 Signalmodulen genauer zu untersuchen, wurden in Zusammenarbeit mit Julia Engel, Smu1 und Cla4 in $\Delta rac1$ und in $\Delta cdc42$ Mutanten depletiert. In allen vier Fällen, waren die Zellen lebensfähig. Dabei wies die Rac1/Cla4 Doppeldepletion jedoch

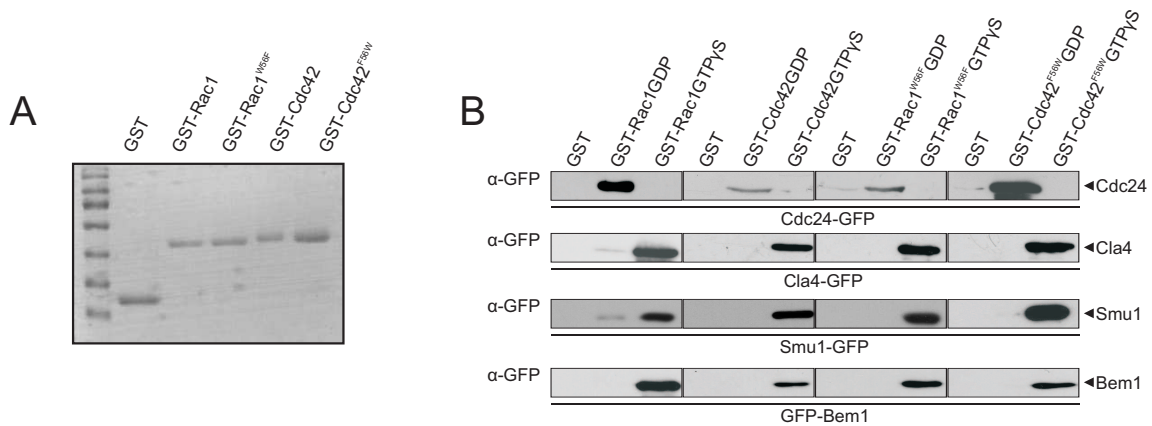


Abbildung 2.21: Weder das Gerüstprotein Bem1, noch die Effektoren Cla4 und Ste20 diskriminieren zwischen Cdc42 und Rac1 A) GST-Rac1, GST-Rac1^{W56F}, GST-Cdc42 und GST-Cdc42^{F56W} wurden in *E. coli* exprimiert, über Affinitätschromatographie gereinigt und im SDS Gel durch „Coomassie brilliant blue“ Färbung sichtbar gemacht. B) Die aufgereinigten GTPasen wurden entweder mit GDP oder mit nicht hydrolysierbarem GTPγS beladen und mit *U. maydis* Proteinextrakten von Stämmen inkubiert, die GFP-Fusionen von Cdc24, Cla4, Smu1 und Bem1 ektopisch überexprimierten. Die Interaktionspartner wurden mittels GSH-Agarose kopräzipitiert und mit GFP-Antikörpern auf PVDF Membranen sichtbar gemacht.

die stärkste Fragmentierung der Vakuolen auf und die Cdc42/Smu1 Doppeldepletion die schwächste (Abb. 2.19 B und C).

Die Fähigkeit von Rac1 und Cdc42 sowohl mit Cla4, als auch mit Smu1 mit gleicher Affinität zu interagieren, konnte durch Interaktionsstudien bestätigt werden. GST-Rac1 und GST-Cdc42 waren in ihrer GTP-gebundenen Konformation in der Lage, gleiche Mengen an Cla4-GFP und Smu1-GFP zu präzipitieren (Abb. 2.21 B).

Die Interaktion von Rac1 und Cla4 wird während des polaren Wachstums durch das Gerüstprotein Bem1 vermittelt. Die Depletion des essentiellen Proteins Bem1 führt zum Polaritätsverlust und zur starken Fragmentierung der Vakuolen (Abb. 2.19 B). Dabei ist die Anzahl der nachweisbaren vakuolären Strukturen in der Zelle jedoch geringer als bei einer Doppeldepletion von Rac1 und Cdc42, was jedoch vermutlich auf das deutlich kleinere Zellvolumen der *bem1* Mutanten zurückzuführen ist. Auch das Gerüstprotein Bem1 konnte sowohl mit Rac1-GTP, als auch mit Cdc42-GTP präzipitiert werden (Abb. 2.21 B). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass kreuzweise Interaktionen zwischen dem Rac1- und dem Cdc42-abhängigen Signalweg, sowohl beim aktivierenden Schritt (Cdc24), als auch auf der Ebene der Effektorstimulation (Cla4/Smu1) im Komplex mit dem Gerüstprotein Bem1 stattfinden können (Abb. 2.21 D).

2.3.2 Die Mutante Cdc42^{F56W} gewinnt Rac1-Signalspezifität und verliert Cdc42-Funktionalität

Basierend auf der Beobachtung, dass Cdc42 mit ähnlicher Affinität wie Rac1 mit Bem1 und Cla4 interagiert, kann geschlossen werden, dass der einzige Grund, warum Cdc42 Rac1 *in vivo* nicht vollständig ersetzen kann, von der geringeren Affinität des Aktivators Cdc24 für Cdc42 herrührt. Um diese Theorie experimentell zu untermauern, wurde durch Einführung einer Punktmutation (F56W) in Cdc42 versucht, diese GTPase zu einem besseren Substrat für Cdc24 zu machen. Alle bekannten Cdc42 Proteine tragen an Position 56 ein Phenylalanin (F), während alle bekannten Rac1 Proteine ein Tryptophan (W) an dieser Position aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass ein Austausch von F und W an dieser Position die GTPasen zum Substrat für die GEFs der jeweils anderen machen kann (Gao et al., 2001; Snyder et al., 2002). Die katalytische DH-PH Tandem Domäne von Cdc24 verhielt sich in einem von Kay Schink durchgeführten *in vitro* Aktivitätstest gegenüber GST-Cdc42^{F56W} und GST-Rac1^{W56F} wie erwartet. GST-Cdc42^{F56W} wurde durch Cdc24 mit hoher Effizienz aktiviert, während die Affinität des GEFs für GST-Rac1^{W56F} drastisch reduziert war (Kay Schink, Dissertation und Abb. 2.22 A). *In vivo* war die Einführung von Cdc42^{F56W} in Deletionsmutanten von *rac1* ausreichend, um durch Cdc24 Überexpression Filamente zu induzieren, während dies durch Einführung der korrespondierenden Rac1^{W56F} Mutante nicht möglich war (Abb.

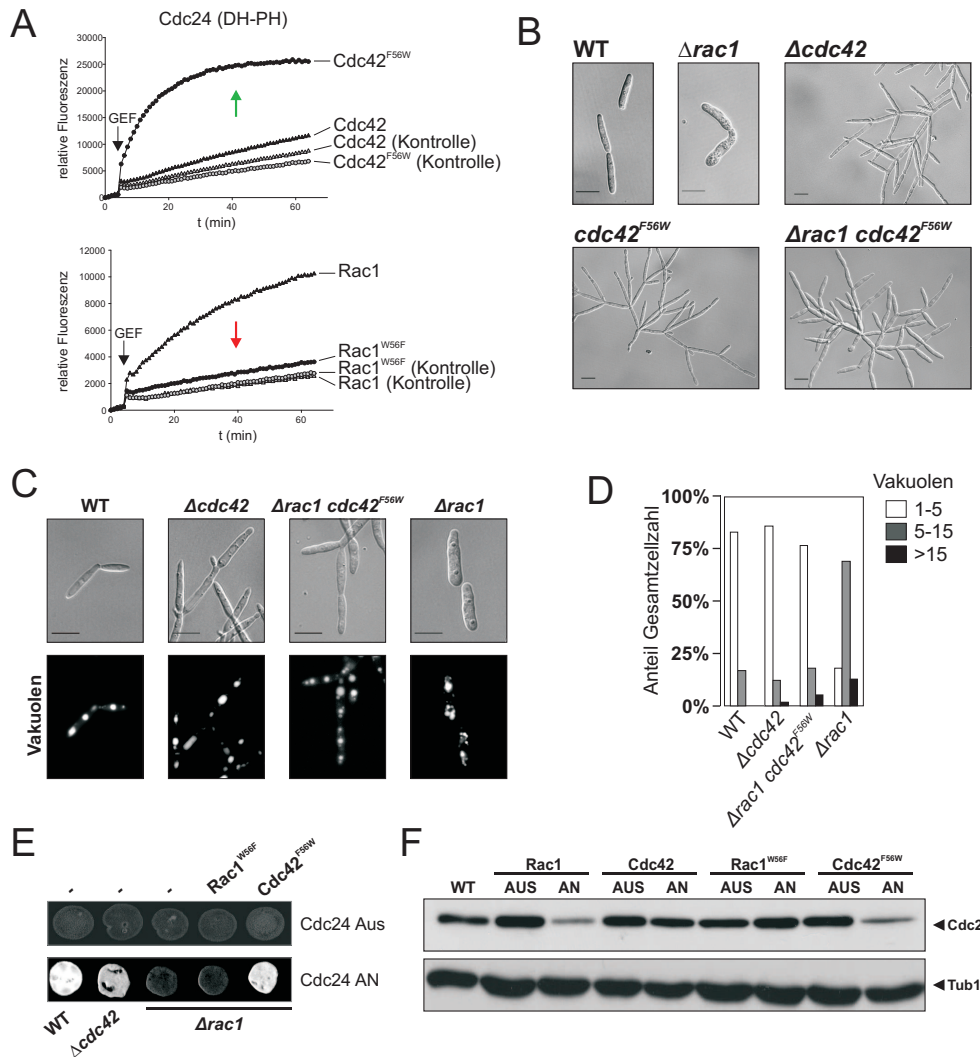


Abbildung 2.22: Die Mutante Cdc42^{F56W} gewinnt Rac1-Signalspezifität, verliert jedoch ihre Cdc42-Funktionalität **A)** *in vitro* Test der Aktivierung von GST-Cdc42^{F56W} und GST-Rac1^{W56F} durch das katalytische DH-PH Tandem von Cdc24. Gemessen wurde die Inkorporation von mant-GDP in die GTPasen (Die „GEF-assays“ wurden von Kay Schink durchgeführt). **B)** Erscheinungsbild von Zellen, die Cdc42^{F56W} an Stelle von Cdc42 am genomischen Locus und in der An- und Abwesenheit von Rac1 exprimieren. Wildtyp, $\Delta rac1$ und $\Delta cdc42$ Zellen sind zum Vergleich gezeigt. Der Größenstandard entspricht 10 μ m (Die Mutante $cdc42^{F56W}$ wurde von Britta Tillmann zur Verfügung gestellt). **C)** Vakuolenmorphologie in $\Delta rac1$ Zellen, die Cdc42^{F56W} am natürlichen Locus exprimieren. Die Vakuolen wurden mit „CellTracker blue“ (Molecular Probes) gefärbt. Die Vakuolenmorphologie von Wildtyp, $\Delta rac1$ und $\Delta cdc42$ Zellen ist zum Vergleich gezeigt. **D)** Quantifizierung (n=50) der Vakuolenzahl in den in (C) gezeigten Zellen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Zellen mit bis zu fünf, zwischen sechs und fünfzehn und mit mehr als sechzehn Vakuolen an der Gesamtzellpopulation. **E)** Wildtyp, $\Delta cdc42$ und $\Delta rac1$ Zellen, die Cdc24 überexprimierten, wurden auf aktivkohlehaltiges Festmedium aufgetropft. Die Cdc24-induzierte Filamentbildung wird durch das weiße Mycel angezeigt. Die Filamentbildung konnte in $\Delta rac1$ Mutanten durch die ektopische konstitutive Expression von Cdc42^{F56W} gerettet werden, jedoch nicht durch Rac1^{W56F}. **F)** Auswirkungen der Überexpression von Rac1^{W56F} und Cdc42^{F56W} auf das endogene Cdc24-3xHA Niveau. Die GTPasen wurden ektopisch unter der Kontrolle des *crg* Promotors exprimiert. Die Flüssigkulturen wurden mit Glukose (AUS) angezogen und anschließend acht Stunden mit Arabinose (AN) inkubiert.

2 Ergebnisse

2.22 E). Die Aktivierung von Cdc42^{F56W} durch Cdc24 und die damit verbundene Stimulation von Cla4 führte zum Abbau von Cdc24 (Abb. 2.22 F). Aus den beschriebenen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass Cdc42^{F56W} alle Rac1 Funktionen während des polaren Wachstums von *U. maydis* übernehmen kann. Die Expression von Cdc42^{F56W} am genomischen Locus in $\Delta rac1$ Zellen, führte neben der Aufhebung des Polaritätsdefektes auch zu einer Suppression der Vakuolenfragmentierung (der Stamm wurde freundlicherweise von Britta Tillmann zur Verfügung gestellt). Die Zellen wiesen eine normale Vakuolengröße und Zahl auf (Abb. 2.21 C und D). Cdc42^{F56W} konnte also auch die für die Integrität der Vakuolen essentielle Funktion alleine übernehmen. Jedoch wiesen alle Zellen, die Cdc42^{F56W} am genomischen Locus exprimierten, einen Zellseparierungsdefekt auf, der mit dem von *cdc42* Deletionsmutanten vergleichbar war (Abb. 2.22 B). Dies kommt vermutlich dadurch zustande, dass sich Cdc42^{F56W} *in vivo* wie Rac1 verhält und daher nicht in der Lage ist Cdc42 während der Zytokinese zu ersetzen. Von Kay Schink und Britta Tillmann konnte gezeigt werden, dass Cdc42^{F56W} *in vitro* schlechter durch die Cdc42-spezifischen GEFs Don1 und Hot1 erkannt wird als Cdc42. Hinzu kommt, dass die Aminosäure an Position 56 in der Effektorschleife der GTPase liegt und eine Mutation an dieser Stelle auch Auswirkungen auf die Interaktion mit Effektoren haben kann (Karnoub et al., 2001).

3 Diskussion

3.1 Dynamische Regulation des Cdc24/Bem1/Rac1/Cla4 Signalmoduls

3.1.1 Die Cla4 abhängige Phosphorylierung von Cdc24 induziert den Abbau des GEFs

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Rho-GEF Cdc24 die GTPase Rac1 während des polaren Wachstums von *U. maydis* aktiviert. Die Aktivierung von Rac1 führt sowohl während der Knospung, als auch während des filamentösen Wachstums, zu einer negativen posttranslationellen Regulation von Cdc24. Während des polaren Wachstums wird Cdc24 durch Cla4-abhängige Phosphorylierung destabilisiert. Das Homolog von Cdc24 in *S. cerevisiae*, Cdc24p, ist auch ein Substrat für Cla4p-abhängige Phosphorylierung. Die biologische Funktion dieser Modifikation wird jedoch kontrovers diskutiert (Bose et al., 2001; Gulli et al., 2000; Irazoqui et al., 2003). Es wurde beschrieben, dass die Cla4-abhängige Phosphorylierung von Cdc24 die Dissoziation des GEFs aus dem Komplex mit dem Gerüstprotein Bem1p reguliert und so eine negative regulatorische Rückkopplungsschleife konstituiert (Gulli et al., 2000). Diese Sichtweise wurde durch eine andere Studie in Frage gestellt, in der kein Einfluss der Cla4-abhängigen Phosphorylierung auf die Cdc24-Bem1 Interaktion festgestellt werden konnte (Bose et al., 2001). In diesem Zusammenhang wurde spekuliert, dass die Phosphorylierung des GEFs einen positiven Einfluss auf die Aktivität des GEFs hat (Bose et al., 2001; Kozubowski et al., 2008). Eine Cdc24p Mutante, in der alle durch massenspektrometrische Analysen identifizierten Phosphorylierungsstellen zu Alanin mutiert waren, zeigte keine Defekte in Stabilität und Funktion (Wai et al., 2009). Während also in *S. cerevisiae* durchaus in Frage gestellt werden kann, dass die Phosphorylierung von Cdc24p eine biologische Funktion hat, so konnte eine solche in *U. maydis* im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden. Es gelang, eine kurze, 62 Aminosäuren umfassende Region zu identifizieren, die sowohl notwendig, als auch ausreichend ist, um den Cla4-induzierten Abbau von Cdc24 zu gewährleisten. Die Mutation aller Serine und Threonine in diesem Bereich führte zu einer signifikanten Stabilisierung des GEFs, wobei seine Aktivität nicht beeinflusst war. Der Vergleich mit Cdc24p aus *S. cerevisiae* zeigte, dass keine dieser potentiellen

Phosphorylierungsstellen zwischen *U. maydis* und der Bäckerhefe konserviert sind. Da die Mutation einzelner Serine und Threonine die Proteinstabilität von Cdc24 nicht veränderten, ist anzunehmen, dass eine multiple Phosphorylierung innerhalb dieser Region für den Abbau von Cdc24 notwendig ist. Die Regulation von Proteinen durch multiple Phosphorylierung ist ein weitverbreitetes Phänomen (Salazar and Höfer, 2009). So wird z.B. in *S. cerevisiae* die Stabilität des CDK Inhibitors Sic1p und des Transkriptionsfaktors Tec1p durch multiple Phosphorylierung reguliert (Nash et al., 2001; Bao et al., 2010). Dies ermöglicht die Erkennung der Proteine durch Cdc4, einer Untereinheit des SCF E3 Ubiquitin Ligase Komplexes (Deshaies and Joazeiro, 2009). In Säugern wurde auch bereits die Regulation von zwei humanen Rho-GEFs der Dbl-Familie, FGD1 und FGD3, durch SCF-abhängigen Abbau beschrieben (Hayakawa et al., 2005, 2008). Daher kann spekuliert werden, ob das phosphorylierte Cdc24 in *U. maydis* ebenfalls durch eine bislang noch unbekannte Ubiquitin Ligase erkannt und dann Ubiquitin-abhängig abgebaut wird. Alle Versuche eine Ubiquitinierung von Cdc24 nachzuweisen, blieben jedoch bislang ohne Erfolg, da noch kein Weg gefunden wurde, Proteasominhibitoren stabil in *U. maydis* Zellen einzuschleusen.

Während des filamentösen Wachstums konnte beobachtet werden, dass das stabilisierte Cdc24* zwar deutlich langsamer als der nicht mutierte GEF, aber dennoch reproduzierbar einer posttranslationellen Destabilisierung ausgesetzt war. Ob es sich dabei um einen Cla4-unabhängigen Mechanismus handelt, oder ob es weitere, noch unbekannte Phosphorylierungsstellen gibt, die einen Einfluss auf die Stabilität von Cdc24 haben, muss an dieser Stelle offen bleiben.

3.1.2 Der Abbau von Cdc24 beschränkt die Aktivität des Bem1/Rac1-GTP/Cla4 Signalmoduls auf die wachsende Spitze

Für das polarisierte Wachstum von *U. maydis* ist es von essentieller Bedeutung die Wachstumsaktivität auf einen Punkt zu beschränken. In *S. cerevisiae* wird dieser Punkt normalerweise durch die Knospungsstelle markierende Proteine festgelegt (Casamayor and Snyder, 2002). Eine wichtige Aufgabe übernimmt dabei die Ras-GTPase Rsr1p (Gulli and Peter, 2001). Jedoch sind die Zellen auch in Abwesenheit von Rsr1p in der Lage, eine einzelne Knospe an einer zufälligen Position zu bilden, ein Phänomen, das als „symmetry-breaking“ beschrieben wurde (Irazoqui et al., 2003). Die Frage, wie in diesem Fall ein stabiler Gradient von aktivem Cdc42-GTP etabliert und aufrecht erhalten wird, wurde durch zwei widerstreitende Modelle erklärt. Basierend auf Untersuchungen mit konstitutiv aktivem Cdc42p wurde postuliert, dass aktives Cdc42p am Zellkortex den aktinabhängigen Transport von weiteren Cdc42p Molekülen stimu-

liert, was zu einem wachsenden Aggregat von aktivem Cdc42p führt (Wedlich-Söldner et al., 2003). Durch mathematische Modellierung und Simulation des Vesikeltransports, wurde dieses einfache Modell jedoch angezweifelt (Layton et al., 2011). In einem alternativen Model wird postuliert, dass aktives Cdc42p-GTP den zytoplasmatischen Cdc24p/Bem1p/Cla4p Komplex an die Membran rekrutiert. Der membranassoziierte Komplex erzeugt dann durch die Aktivität von Cdc24p weitere aktive Cdc42p Proteine, die ihrerseits weitere Komplexe rekrutieren, wodurch die Konzentration von Cdc42p-GTP lokal ansteigt (Goryachev and Pokhilko, 2008; Irazoqui et al., 2003; Kozubowski et al., 2008). Die Beschränkung der Knospung auf nur ein wachsendes Cdc42-GTP Aggregat kommt dabei vermutlich dadurch zustande, dass die wachsenden Aggregate um eine limitierte Menge an Cdc24p/Bem1p/Cla4p Komplex kompetitieren (Howell et al., 2009).

In *U. maydis* hängt die Zellpolarisation zwingend von der Bildung eines ternären Bem1/Rac1-GTP/Cla4 Komplexes ab. Die Generierung eines stabilen Gradienten von aktiven Bem1/Rac1-GTP/Cla4 Komplexen an der Spitze von Knospen und Filamenten wird vermutlich über mehrere ineinandergreifende Mechanismen erreicht. Der Mechanismus, der die Initiation des polaren Spitzenwachstums selektiv auf einen Zellpol beschränkt ist dabei unklar. Die Deletion des *U. maydis* Homologs von Rsr1p hatte keinen Einfluss auf das Knospungsmuster, sondern nur auf die Geschwindigkeit, mit der nach abgeschlossener Zellteilung eine neue Tochterzelle gebildet wurde (Sabrina Patzak, Diplomarbeit). Aktives Cdc24 interagiert mit dem Bem1/Cla4 Modul und rekrutiert Rac1-GDP in einen transienten, durch Kopräzipitation nachweisbaren, Cdc24/Bem1/Rac1/Cla4 Komplex (Abb 3.1). Die Aktivierung von Rac1 erhöht dessen Affinität zu Bem1. Dabei dient der Prenylanker von Rac1 vermutlich der Stabilisierung von Bem1 an der Membran, da GFP-Bem1 in Abwesenheit von Rac1 nicht an der Zellspitze lokalisierte. Rac1-GTP interagiert mit Cla4 und stimuliert dadurch vermutlich dessen Kinaseaktivität (Abb 3.1). Die aktive Cla4 Kinase stimuliert das polare Wachstum durch Phosphorylierung von noch nicht identifizierten Effektoren. Gleichzeitig kommt es zur Phosphorylierung von Cdc24, was dessen Abbau induziert (Abb 3.1).

Die Tatsache, dass Cdc24 gebraucht wird, um Rac1 während des polaren Wachstums zu aktivieren, lässt den verstärkten Abbau des GEFs während des polaren Wachstums zunächst kontraintuitiv erscheinen. Die einzige plausible Erklärung ist, dass ein Verbleiben von Cdc24 im Komplex mit Bem1, Rac1-GTP und Cla4 für das polare Wachstum hinderlich wäre. Aktives Rac1-GTP muss auf die wachsende Spitze beschränkt werden. Dies wird vermutlich durch die in dieser Arbeit identifizierten Rac1-GAPs Rip1, Bem2 und Bem3 erreicht (siehe Abschnitt 3.1.3 für eine detaillierte Diskussion). Es ist anzunehmen, dass die Rac1-GAPs eine subapikale „Zone der Inhibition“ konstituieren, wie sie z.B. in *S. cerevisiae* zur Verhinderung der Knospung innerhalb der alten

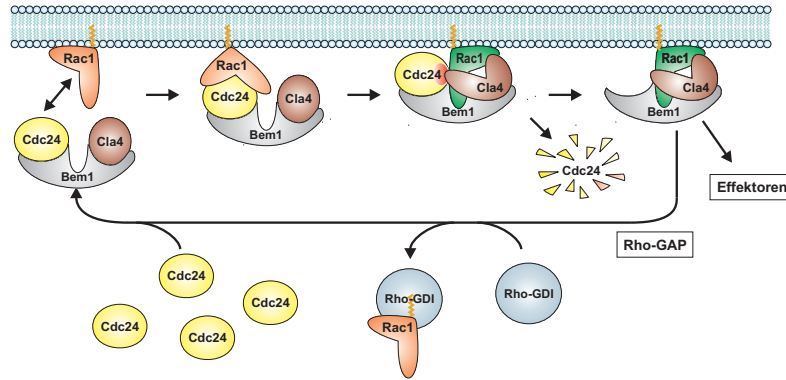


Abbildung 3.1: Schematisches Modell für die negative Rückkopplungsregulation des GEFs Cdc24. Cdc24 und Cla4 interagieren mit dem Gerüstprotein Bem1. Cdc24 rekrutiert inaktives Rac1-GDP (orange) in den Komplex. In diesem quaternären Übergangskomplex wird Rac1 durch den von Cdc24 stimulierten GDP-GTP Austausch aktiviert. Rac1-GTP (grün) interagiert mit Cla4 und stimuliert vermutlich dessen Aktivität (offene Konformation). Cla4 phosphoryliert Cdc24 (roter Punkt) und induziert so den Abbau des GEFs. Zurück bleibt ein ternärer Bem1/Rac1-GTP/Cla4 Komplex, der das polare Wachstum über die Stimulation von noch unbekannten Faktoren reguliert. Die Inaktivierung des Komplexes und die Wiederverwendung der Proteine wird durch Interaktion mit Rac1-GAPs und dem GDI Rdi1 sichergestellt.

Knospungsstelle beschrieben wurde (Tong et al., 2007). Es kann vermutet werden, dass ein Verbleiben von Cdc24 im Bem1/Rac1-GTP/Cla4 Komplex einer Inaktivierung von Rac1 durch sofortige Reaktivierung entgegenwirken könnte. Für diese Theorie spricht, dass die Expression von stabilisiertem Cdc24* sowohl während der Knospung, als auch bei der Initiation des filamentösen Wachstums, Auswirkungen hatte. Die Zellen waren länger und dicker, wobei die Knospenspitzen deutlich abgerundet waren, was für eine schlechtere Fokussierung der Rac1, bzw. der Cla4 Aktivität spricht. Die beobachtete deutliche Verzögerung der Filamentinduktion ist vermutlich ebenfalls auf Probleme bei der Generierung eines stabilen Rac1-GTP Gradienten zurückzuführen. Offenbar spielt die negative Rückkopplungsregulation von Cdc24 auch bei der Pflanzeninfektion durch *U. maydis* eine Rolle. Die Reduktion der Virulenz von Stämmen, die die stabilisierte Variante Cdc24* exprimierten, kann vermutlich auf die beobachtete verzögerte Filament- und Appressorienbildung zurückgeführt werden. Darüber, ob es in der Pflanze zu weiteren Verzögerungen im polaren Wachstum kommt, kann an dieser Stelle nur spekuliert werden.

3.1.3 Die Inaktivierung des Bem1/Rac1-GTP/Cla4 Komplexes während des polaren Wachstums

In dieser Arbeit konnten drei Rac1-GAPs identifiziert werden, die sowohl bei Depletion, als auch bei Überexpression Auswirkungen auf das polare Wachstum und die

3 Diskussion

Stabilität von Cdc24 haben. Die Depletion der GAPs resultierte in einer signifikanten Zellverlängerung und Stabilisierung von Cdc24. Dies lässt sich dadurch erklären, dass der Bem1/Rac1-GTP/Cla4 Komplex mangels GAP-Aktivität länger aktiv bleibt. Die GAP-stimulierte GTP Hydrolyse bewirkt auch die Dissoziation von Rac1 und Bem1. Während inaktives Rac1-GDP in der Membran verbleibt, stehen Cla4 und Bem1 für eine erneute Komplexbildung zur Verfügung (Abb 3.1). Die verzögerte Inaktivierung von Rac1 führt in Abwesenheit der GAPs also vermutlich dazu, dass Bem1 zunehmend komplexiert vorliegt. Dadurch steht weniger Bem1 für die Cdc24 konsumierende Bildung von neuen Bem1/Rac1-GTP/Cla4 Komplexen zur Verfügung. Diese Hypothese konnte dadurch bestätigt werden, dass eine erhöhte Expression von Bem1 der Cdc24 Stabilisation in den GAP Mutanten entgegenwirkt. Die Cdc24 stabilisierenden Effekte der Einzeldelationen von *rip1*, *bem2* und *bem3* sind dramatisch, obgleich die Funktion der Proteine im Bezug auf die Inaktivierung von Rac1 redundant zu sein scheint. Dies kann vermutlich dadurch erklärt werden, dass die drei Rac1-GAPs räumlich und/oder zeitlich voneinander getrennt agieren. In einem solchen Modell würde jeder der drei GAPs die Freisetzung eines distinkten Anteils an der Gesamtzahl der Bem1 Moleküle aus dem Komplex mit aktivem Rac1 regulieren (Abb. 3.2). Die Deletion eines einzelnen GAPs führt in diesem Modell zur Sequestrierung von Bem1 in dem normalerweise von dem GAP kontrollierten räumlichen und/oder zeitlichen Bereich (Abb. 3.2). Ein erster Hinweis darauf, dass jeder der drei möglichen Rac1-GAPs eine eigene „Zone der Inhibition“ bildet, kann in den unterschiedlichen Lokalisationen von Rip1, Bem2 und Bem3 gesehen werden.

Die Beobachtung, dass die Überexpression der Rac1-GAPs zu einer Zellverlängerung und einem Abbau von Cdc24 führt, war unerwartet. So wurde für die GAPs Bem2p und Bem3p in *S. cerevisiae* ein Überexpressionsphänotyp beschrieben, der dem von Zellen gleicht, die eine temperatursensitive Variante von Cdc42p bei nichtpermissiver Temperatur exprimieren (Caviston et al., 2003). Die Überexpression von GAP-minus Mutanten führte hingegen zu elongierten Knospen (Caviston et al., 2003). Bem2p und Bem3p lokalisieren in *S. cerevisiae* in der G1 Phase des Zellzyklus am Zellkortex, wo sie vermutlich die verfrühte Aktivierung von Cdc42p verhindern (Knaus et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass beide Cdc42-GAPs Cdc28-abhängig phosphoryliert werden, wodurch ihre Aktivität herabgesetzt werden soll (Knaus et al., 2007). Es wurde postuliert, dass diese Inhibition der GAPs die Cdc42p Aktivierung an der Knospungsstelle und damit die Knospung ermöglicht (Knaus et al., 2007). In *U. maydis* führt die Überexpression der Rac1-GAPs nicht zu einer Inaktivierung der GTPase. Statt zum Polaritätsverlust, kommt es zur Hyperpolarisierung und Zellverlängerung. Dies lässt sich dadurch erklären, dass eine erhöhte GAP-Aktivität an der Zellspitze zu einem schnelleren Umsatz von Bem1/Rac1-GTP/Cla4 Komplexen führt, was auch den drastisch

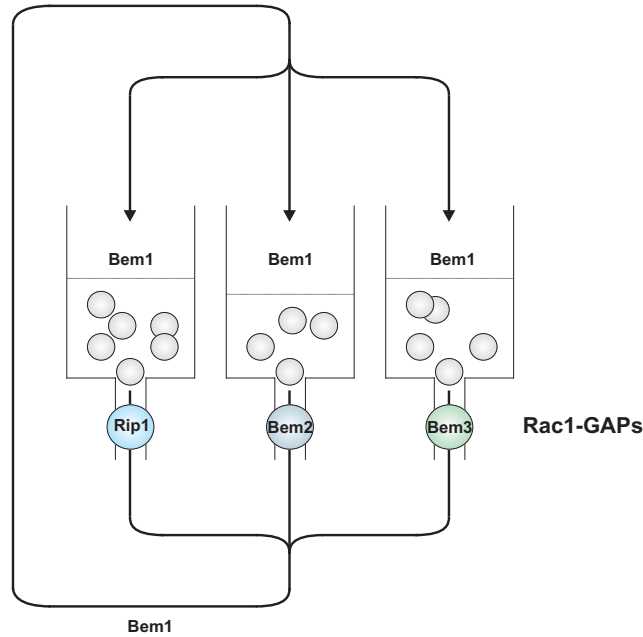


Abbildung 3.2: Drei Rac1-GAPs kontrollieren die Rezyklisierung von Bem1. Die Inaktivierung von Rac1-GTP durch die GAPs Rip1, Bem2 und Bem3 bewirkt vermutlich die Freisetzung von Bem1 aus dem Komplex mit Rac1. Dabei reguliert jeder GAP einen bestimmten „Pool“ des Gerüstproteins, der räumlich und/oder zeitlich von dem der anderen getrennt ist. Die Deletion eines GAPs führt zur Sequestrierung von immer mehr Bem1 in einem der „Pools“, wodurch immer weniger Gerüstprotein in den anderen zur Verfügung steht.

erhöhten Verbrauch von Cdc24 erklärt.

GAP-Aktivität wird während des polaren Wachstums von *U. maydis* also nicht von der Zone, in der das polare Wachstum stattfindet ausgeschlossen, sondern ist im Gegenteil eine elementare Voraussetzung. So ist eine GAP insensitive Variante von Rac1 (Rac1^{EN91/92HH}) nicht in der Lage, bei Überexpression Filamente mit normaler Morphologie zu erzeugen. Dass der Wechsel zwischen der GDP- und der GTP-gebundenen Form einer GTPase für den von ihr regulierten Prozess wichtig sein kann, wurde auch in anderen Systemen beobachtet. So ist dies offenbar bei der Zellfusion während der Zellpaarung von *S. cerevisiae* unverzichtbar (Barale et al., 2006). In Säugern kolokalisiert der GAP SH3BP1 mit Rac1 am vorderen Zellende von migrierenden Fibroblasten, wo er vermutlich in Kombination mit dem GEF Tiam1 für einen „GTPase-Flux“ von Rac1 sorgt, der für die Ausbildung von Ausstülpungen essentiell ist (Parrini et al., 2011).

In *U. maydis* liegt die Funktion der Rac1-GAPs offenbar darin, das Wachstum auf die Zellspitze zu beschränken. Ein „Durchbrechen“ dieser „Zone der Inhibition“ sei es durch Insensitivität von Rac1 gegenüber den GAPs, oder durch sofortige Reaktivierung der GTPase durch den stabilisierten GEF Cdc24*, führt zu delokalisierter Rac1-Aktivität, die das polare Wachstum stört. Interessanterweise sind die so mutierten Zellen aber nicht

apolar. Es muss also noch weitere Mechanismen geben, die einen wichtigen Einfluss auf die Beschränkung des aktiven Bem1/Rac1-GTP/Cla4 Komplexes auf den Bereich des Spitzenwachstums haben. Diese basieren offenbar auf dem Rho-GDI Rdi1. GDIs sind in vielen Organismen als Regulatoren des polaren Wachstums beschrieben. So ist z.B. die Interaktion der Rac-Rop GTPase Rop2 mit ihrem Rho-GDI in *Arabidopsis thaliana* für die Positionierung und die Elongation von Haarwurzeln von Bedeutung (Carol et al., 2005) und in Tabakpflanzen ist der Rho-GDI2 für die Regulation der Rac-Rop Aktivität während des Wachstums von Pollenschläuchen wichtig (Klahre et al., 2006). Auch in *S. cerevisiae* bindet und extrahiert der GDI Rdi1p Cdc42p aus der Membran (Masuda et al., 1994). Dabei konstituiert Rdi1p einen von zwei möglichen Wegen der Rezyklisierung von Cdc42p während des polaren Wachstums (Slaughter et al., 2009). Ein zweiter, redundanter Weg, erfolgt über die aktinabhängige Endozytose (Slaughter et al., 2009). Beide Mechanismen sind offenbar auch in *U. maydis* verwirklicht. Knospende Zellen, die eine *rdi1* Deletion tragen, weisen keinen Polaritätsdefekt auf. Die Rezyklisierung von Rac1 scheint jedoch verzögert zu verlaufen, da ein signifikant stabilisierender Effekt auf die Cdc24 Menge feststellbar war, der durch eine verstärkte Expression von Rac1 wieder aufgehoben werden konnte. Die Überexpression von Rdi1 resultierte sowohl in einer Zellverlängerung, als auch in einer Destabilisierung von Cdc24. Dies erscheint bei erster Betrachtung nicht einleuchtend. In *S. cerevisiae* führt eine Überexpression von Rdi1p zu einem mit dem der Inaktivierung von Cdc42^{ts} vergleichbaren Phänotyp, da Cdc42 aus der Membran entfernt wird (Masuda et al., 1994). In *U. maydis* kommt es durch die erhöhte Konzentration von Rdi1 auch zum Entfernen von Rac1 aus der Plasmamembran. Die damit verbundene größere Verfügbarkeit der GTPase führt jedoch offenbar zu einem erhöhten Flux von Rac1 am wachsenden Pol, was wiederum in dem zunehmenden Abbau von Cdc24 resultiert.

Die Beobachtung, dass *rdi1* Mutanten keinen starken Phänotyp haben und die Überexpression von GDI insensitivem Rac1 (Rac1^{R66E}) zur Filamentinduktion ausreichend ist, weist darauf hin, dass die aktinabhängige Endozytose in *U. maydis* ebenfalls zur Rezyklisierung von Rac1 beiträgt. Dies konnte dadurch bestätigt werden, dass die Inhibition der Endozytose ebenfalls einen signifikant stabilisierenden Effekt auf das Cdc24 Niveau hatte, der mit dem der Deletion von *rdi1* additiv wirkte.

Sowohl die in dieser Arbeit identifizierten Rac1-GAPs, als auch der GDI Rdi1 und die aktinabhängige Endozytose sind in *U. maydis* für das polare Wachstum wichtig. Nach der Entfernung von Cdc24 aus dem aktiven Bem1/Rac1-GTP/Cla4 Komplex diffundiert dieser vermutlich lateral in der Membran bis er die postulierte subapikale Zone der hohen GAP Aktivität erreicht (Abb. 3.3 2 und 3). Die GAP stimulierte GTP Hydrolyse bewirkt den Zerfall des Komplexes. Bem1 und Cla4 werden über einen noch unbekannten Mechanismus einer erneuten Komplexbildung zur Verfügung gestellt und

Polares Spitzenwachstum

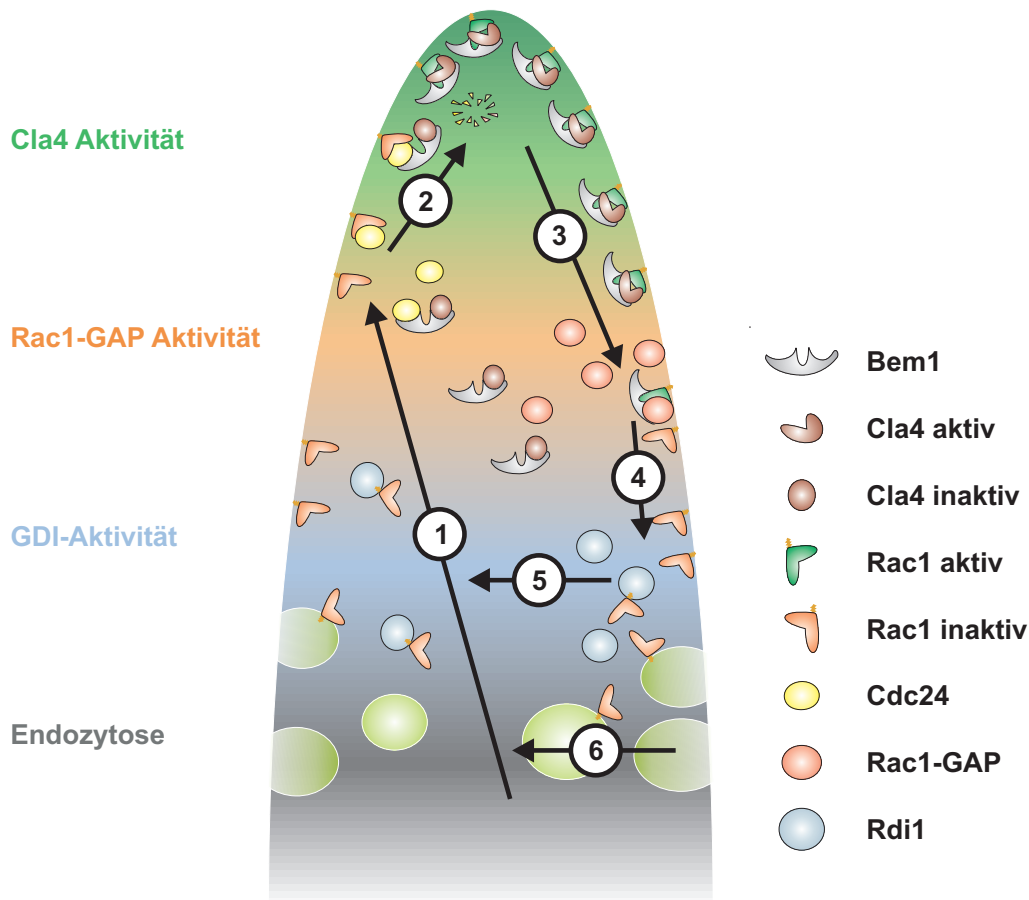


Abbildung 3.3: Schematisches Modell für die zyklische Aktivierung und Deaktivierung von Rac1 während des polaren Spitzenwachstums. (1) Rekrutierung von Rac1-GDP in den Komplex mit Bem1 und Cla4. (2) Aktivierung von Rac1 durch Cdc24, Stimulierung von Cla4 und Abbau von Cdc24. (3) Der aktive Komplex diffundiert in retrograder Richtung in der Membran. (4) Rac1-GTP wird durch einen Rac1-GAP zur GTP-Hydrolyse angeregt. Zerfall des Komplexes. (5) Rdi1 löst Rac1-GDP aus der Membran. (6) In der Membran verbliebenes Rac1 wird endozytiert.

Rac1-GDP verbleibt in der Membran (Abb. 3.3 4). Rac1 kann von Rdi1 gebunden und aus der Membran herausgelöst werden. Die Bindung des GDI ist dabei vermutlich vom gebundenen Nukleotid unabhängig, es konnte aber gezeigt werden, dass GDIs präferentiell an GTPasen binden, die nicht in Multiproteinkomplexen vorliegen (Slaughter et al., 2009) (Abb. 3.3 5). Alternativ kann Rac1 durch die Formierung endozytotischer Vesikel internalisiert und einer erneuten Aktivierung zur Verfügung gestellt werden (Abb. 3.3 6). Die Unterbindung dieser Rezyklisierungsmechanismen für Rac1, Bem1 und Cla4 resultierten in einer Stabilisierung von Cdc24. Dabei wirken die stabilisierenden Effekte der Sequestrierung von Bem1 durch GAP-Insensitivität und die der mangelnden Re-

zyklisierung von Rac1 durch Verhinderung der Internalisierung der GTPase von der Membran, additiv. Der stabilisierende Effekt der Überexpression von GAP- und GDI-insensitivem Rac1 (Rac1^{R66E/EN91/92HH}) führt zu einer Erhöhung des Cdc24 Niveaus, die mit der durch Überexpression von konstitutiv aktivem Rac1^{Q61L} vergleichbar ist. Beide GTPasen halten Bem1 durch ihre GAP Insensitivität im ternären Komplex gebunden, was erklärt, warum eine erhöhte Expression von Bem1 dem stabilisierenden Effekt der Rac1 Varianten entgegenwirkt. Auch die Entfernung aus der Membran ist bei beiden Rac1 Varianten beeinträchtigt. So kann Rac1^{R66E/EN91/92HH} auch bei Inaktivierung durch seine intrinsische GTPase-Aktivität nicht von Rdi1 gebunden werden, was eine erneute Aktivierung verhindert. Rac1^{Q61L} liegt vermutlich hauptsächlich im Komplex mit Bem1 und Cla4 vor und ist daher ein schlechtes Substrat für Rdi1. Die lethale Wirkung der Rac1^{Q61L} Überexpression ist jedoch von der Fähigkeit der GTPase mit Rdi1 zu interagieren abhängig. Es kann spekuliert werden, ob die Interaktion mit dem GDI benötigt wird, um Rac1^{Q61L} nach der posttranslationellen C-terminalen Modifikation vom Endoplasmatischen Retikulum an die Membran zu bringen, wobei der GDI den Membrananker maskiert (Boulter et al., 2010). Obwohl Rac1^{R66E/EN91/92HH} und Rac1^{Q61L} einen vergleichbaren stabilisierenden Effekt auf das Cdc24 Niveau haben, sind die durch Überexpression induzierten Phänotypen jedoch unterschiedlich. Rac1^{R66E/EN91/92HH} führt zum hyperpolaren Wachstum, wohingegen Rac1^{Q61L} zum isotropen Wachstum und zum Zelltod führt. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Rac1^{Q61L} unabhängig von Cdc24 delokalisiert mit Bem1 interagieren kann.

3.1.4 Die bW/bE-abhängige Aktivierung von Cdc24

Der Übergang zum filamentösen Wachstum wird in *U. maydis* durch den, von zwei kompatiblen *b* Kreuzungstypallelen kodierten, heterodimeren Transkriptionsfaktor bW/bE kontrolliert (Kämper et al., 1995). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die induzierte Expression eines aktiven bW2/bE1 Transkriptionsfaktors die erhöhte Bildung von aktivem Rac1-GTP zur Folge hat, wobei die Proteinmenge von Rac1 jedoch gleich bleibt und auch die Transkription von Cdc24 nicht erhöht wird. Daraus kann gefolgert werden, dass die b-Induktion die Aktivierung und/oder die Lokalisierung von mehr aktivem Cdc24 an die Zellspitze bewirkt. In knospenden *U. maydis* Zellen kann eine signifikante Akkumulation von Cdc24-GFP im Zellkern beobachtet werden, die nach der b-Induktion abzunehmen scheint. Dies führt zu der Frage, ob sich dahinter ein regulatorischer Mechanismus verbergen könnte. Eine Regulation von Cdc24p über die Translokation vom Zellkern ins Zytoplasma wurde in *S. cerevisiae* beschrieben, wo der GEF über die Bindung an Far1p im Zellkern gehalten wird (Toenjes et al., 1999; Nern and Arkowitz, 2000; Shimada et al., 2000). Die zellzyklusabhängige Freisetzung

von Cdc24 wird durch die Degradierung von Far1p eingeleitet (Nern and Arkowitz, 2000). Da *U. maydis* jedoch kein Far1p Homolog besitzt, müsste eine potentielle, von der Lokalisation im Zellkern abhängige Regulation einem anderen Mechanismus folgen. Bevor dem jedoch weiter nachgegangen werden kann, müsste zunächst in Kernextrakten nachgewiesen werden, dass es sich bei den im Kern lokalisierten Proteinen wirklich um vollständiges Cdc24 handelt. Zudem wird die Lokalisation von Cdc24 in *U. maydis* offenbar von Faktoren beeinflusst, die oberhalb des *b* Transkriptionsfaktors agieren. Es konnte gezeigt werden, dass aktives Ras1 die Spitzenlokalisation von Cdc24 beeinflusst (Annette Bauer, Dissertation). Ob Ras1 dabei direkt mit Cdc24 interagieren kann, wie es z.B. in *S. pombe* (Onken et al., 2006) und in *C. neoformans* (Nichols et al., 2007) beschrieben wurde, ist jedoch unklar. Es kann spekuliert werden, dass das bW2/bE1 Heterodimer die Expression eines Faktors kontrolliert, der in der Lage ist, die GEF Aktivität von Cdc24 z.B. über Phosphorylierung zu stimulieren. Die Identifikation eines solchen Regulators erscheint erstrebenswert, um in Zukunft zu einem vertiefteren Verständnis der Prozesse zu gelangen, die die *b*-Induktion mit dem Rac1-abhängigen filamentösen Wachstum verknüpfen.

3.2 Die selektive Aktivierung durch Cdc24 bestimmt die Rac1-Signalspezifität

3.2.1 Rac1 und Cdc42 haben eine gemeinsame essentielle Funktion

In den bisher untersuchten filamentösen Pilzen, die Homologe von Rac1 und Cdc42 enthalten, ist keine der beiden GTPasen essentiell. Die *cdc42/rac1* Doppelmutanten sind jedoch nicht lebensfähig, was auf eine gemeinsame essentielle Funktion hindeutet (Mahler et al., 2006; Kwon et al., 2011; Virag et al., 2007). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cdc24 und Bem1 Teile eines essentiellen Signalweges sind, der neben der Zellpolarität auch die Integrität der Vakuolen beeinflusst. Dies scheint plausibel, da in *S. cerevisiae* eine Beteiligung von Bem1p an der Vakuolenfusion nachgewiesen wurde (Xu and Wickner, 2006). In dem von Bem1 koordinierten essentiellen Signalmodul haben sowohl Rac1 und Cdc42, als auch die Effektoren Smu1 und Cla4, redundante Funktionen. Dies kommt dadurch zustande, dass Bem1 weder zwischen Rac1 und Cdc42, noch zwischen den beiden PAKs diskriminiert. Der Grund, warum *rac1* Mutanten bereits eine schwache Fragmentierung der Vakuole aufweisen, liegt vermutlich darin begründet, dass Cdc24 Cdc42 mit geringerer Präferenz bindet und aktiviert, was eine schlechtere Inkorporation der GTPase in den Komplex mit Bem1 zur Folge hat. Darüber, warum *cla4* Mutanten einen Vakuolendefekt aufweisen, obgleich Cla4 und Smu1 von Rac1 mit gleicher Affinität gebunden werden, kann nur spekuliert werden. Möglicherweise kann

Cla4 besser als Smu1 mit potentiellen Zielproteinen interagieren.

3.2.2 Die Generierung der Rac1-Signalspezifität hängt von Cdc24 ab

In den meisten Organismen übersteigt die Anzahl an spezifischen Effektoren und Aktivatoren die der GTPasen. Die Signalspezifität hängt dabei davon ab, wie der richtige Effektor in Abhängigkeit vom aktivierenden Signal ausgewählt wird. In den vergangenen Jahren war die Frage, wie die Signalspezifität von GTPasen durch Gerüstproteine sichergestellt wird, die neben der Lokalisation auch die Konnektivität von GEF, GTPase und Effektor herstellen, Gegenstand intensiver Forschung (Marinissen and Gutkind, 2005; García-Mata and Burridge, 2007). Wie bereits ausführlich beschrieben, interagieren Cdc24 und der Effektor Cla4 in *U. maydis* mit dem Gerüstprotein Bem1. Eine Beteiligung von Bem1 und Cla4 an der Determination der Rac1-Signalspezifität konnte jedoch durch Kopräzipitationsexperimente ausgeschlossen werden. Sowohl Bem1, als auch Cla4 konnten mit Rac1-GTP und Cdc42-GTP mit vergleichbarer Affinität interagieren. Daraus lässt sich folgern, dass einzig die spezifische Aktivierung von Rac1 durch Cdc24 dazu führt, dass Rac1 und nicht Cdc42 Cla4 im Cdc24/Bem1/Cla4 Komplex aktiviert. Diese Vermutung konnte durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit Cdc42^{F56W} bestätigt werden. Die Aminosäure an Position 56 ist für die spezifische Erkennung von Rac1 und Cdc42 durch ihre GEFs wichtig, wobei Rac1 ein Tryptophan (W) und Cdc42 ein Phenylalanin (F) enthält (Gao et al., 2001; Karnoub et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die GTPase Cdc42^{F56W} *in vitro* spezifisch durch Cdc24 aktiviert wird (Kay Schink, Dissertation; Andrea Hlubek, Dissertation). Überexprimiertes Cdc42^{F56W} war *in vivo* in der Lage, in der Abwesenheit von Rac1 sowohl das polare filamentöse Wachstum, als auch die negative Regulation von Cdc24 zu stimulieren. Auch zeigte ein Stamm, der Cdc42^{F56W} als einzige GTPase des hochkonservierten Rac1/Cdc42 Paares endogen exprimierte, keinen Knospungsdefekt oder Anzeichen von Vakuolenfragmentierung. Daraus lässt sich schließen, dass eine erhöhte Aktivierbarkeit von Cdc42 durch den GEF Cdc24 den Transfer der biologischen Funktion von Rac1 im Cdc24/Bem1/Cla4 Komplex auf Cdc42 ermöglichte. Der GEF bestimmt in diesem Fall also vermutlich alleine, welche zelluläre Antwort generiert wird, unabhängig davon, welche GTPase er für die Weiterleitung des Signals nutzt. Es kam jedoch bei endogener Expression von Cdc42^{F56W} nicht zur Ausbildung des sekundären Septums. Dies war überraschend, da frühere Versuche gezeigt hatten, dass die Überexpression von Cdc42^{F56W} ausreicht um den Deletionsphänotyp von *cdc42* zu supprimieren (Hlubek et al., 2008). Der Zellseparierungsdefekt kann dadurch erklärt werden, dass der Cdc42-spezifische GEF Don1 Cdc42^{F56W} signifikant schlechter

aktiviert (Hlubek et al., 2008). Ähnliche Beobachtungen wurden auch für den Cdc42 spezifischen GEF Its1 gemacht (Andrea Hlubek, Dissertation). Dies impliziert, dass der beobachtete Zellteilungsdefekt von einer nicht ausreichenden Aktivierung der GTPase herrührt. Es konnte zudem gezeigt werden, dass konstitutiv aktives Rac1^{Q61L} im Gegensatz zu Cdc42^{Q61L} nicht in der Lage ist, den Zellteilungsdefekt einer *don1* Deletion aufzuheben (Mahlert et al., 2006). Zusätzlich wurde beobachtet, dass Rac1^{W56F/Q61L} wiederum in der Lage ist, die Zellseparierung zu induzieren (Kay Schink, Dissertation). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass das Phenylalanin an Position 56 auch kritisch für die Interaktion mit Cdc42-spezifischen Effektoren ist.

3.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnte die dynamische Regulation des Bem1/Rac1-GTP/Cla4 Komplexes durch den GEF Cdc24, die Rac1-GAPs Rip1, Bem2 und Bem3 und den GDI Rdi1 zu weiten Teilen aufgeklärt werden. Es ergeben sich aufgrund der hier gemachten Beobachtungen aber auch neue interessante Fragestellungen. So ist in Zukunft von besonderem Interesse, wie die Expression des bW/bE Transkriptionsfaktors mit der Aktivierung von Rac1 durch Cdc24 verknüpft wird. Möglicherweise könnte die damit verbundene Destabilisierung von Cdc24 für die Identifikation eines Cdc24-aktivierenden Faktors während der *b*-Induktion hilfreich sein. Es wäre vorstellbar, nach Mutanten zu suchen, in denen Cdc24 während der Expression von bW/bE stabilisiert ist. Zudem sollte genauer untersucht werden, wie es durch die Expression von stabilisierten Cdc24 Varianten zur Reduktion der Virulenz kommt. Eine weitere wichtige Aufgabe ist die Identifikation von Cla4 Interaktoren. Da Hefe Zwei Hybrid Studien bis jetzt zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis führten, könnte die toxische Überexpression von konstitutiv aktivem Cla4 Δ CRIB für die Suche nach Interaktoren genutzt werden. In diesem Falle müsste eine Mutagenese dieser Proteine zum Überleben der Zellen führen. Eine weitere Fragestellung ergibt sich daraus, wie die Aktivität des von Bem1 koordinierten Komplexes mit der Regulation der polaren Sekretion durch den Exozystkomplex verknüpft ist. Ein detailliertes Studium der Zusammenhänge zwischen der Regulation des Bem1/Rac1-GTP/Cla4 Komplexes, der Regulation des Zytoskelettes durch Cla4 und der Koordination der Sekretion durch den Exozystkomplex wäre für das Verständnis des polaren Wachstums in *U. maydis* von großer Bedeutung.

4 Material und Methoden

4.1 Stämme

4.1.1 *E. coli* Stämme

Name	Genotyp	Verwendung
Top10	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Vermehrung von Plasmiden
BL21-CodonPlus(DE3)-RP(Codon3+)	B F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) dcm ⁺ Tet ^R gal λ(DE3) endA Hte [argU proL Camr]	Überexpression von <i>U. maydis</i> Proteinen

4.1.2 *S. cerevisiae* Stämme

Name	Genotyp	Verwendung
W303	MATα; ura3-52 trp12 leu2-3 ₁₁₂ his3-11 ade2-1 can1-100	Herstellung von Konstrukten in pRS426 durch homologe Rekombination

4.1.3 *Ustilago maydis* Stämme

Name	Genotyp	Referenz
Bub8	<i>a2 b4</i>	(Schulz et al., 1990)
Bub8Δ <i>rac1</i>	<i>a2 b4</i> Δ <i>rac1</i> (Nat ^R)	(Mahlert et al., 2006)
Bub8 <i>rac1</i> ^{kond}	<i>a2 b4</i> P ^{crG} :: <i>rac1</i> (Nat ^R)	(Mahlert et al., 2006)
Bub8 <i>rac1</i> ^{kond} Δ <i>cdc42</i>	<i>a2 b4</i> P ^{crG} :: <i>rac1</i> Δ <i>cdc42</i> (Nat ^R , Hyg ^R)	(Mahlert et al., 2006)
Bub8Δ <i>cdc42</i>	<i>a2 b4</i> Δ <i>cdc42</i> (Hyg ^R)	(Mahlert et al., 2006)
Bub8 <i>cdc42</i> ^{kond}	<i>a2 b4</i> P ^{crG} :: <i>cdc42</i> (Hyg ^R)	(Mahlert et al., 2006)
Bub8Δ <i>cla4</i>	<i>a2 b4</i> Δ <i>cla4</i> (Hyg ^R)	(Leveleki et al., 2004)
Bub8Δ <i>smu1</i>	<i>a2 b4</i> Δ <i>cla4</i> (Hyg ^R)	(Smith et al., 2004)
FB1	<i>a1 b1</i>	(Banuett and Herskowitz, 1989)
AB31	<i>a2</i> P ^{crG} :: <i>bW2/bE1</i> (Phleo ^R)	(Brachmann et al., 2001)
AB33	<i>a2</i> P ^{nar} :: <i>bW2/bE1</i> (Phleo ^R)	(Brachmann et al., 2001)
SG200	<i>a1 mfa2 bW2/bE1</i>	(Kämper et al., 2006)

4.2 Vektoren

Name	Resistenz	Herkunft	Verwendung
PJet2.1	Ampicillin	Fermentas	Klonierung von PCR-Fragmenten zur Vermehrung in <i>E. coli</i>
pUC18	Ampicillin	Laborsammlung	Klonierung von Konstrukten zur Vermehrung in <i>E. coli</i>
pGEX	Ampicillin	Amersham GE Healthcare	Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> (Zur besseren Klonierung wurde eine NdeI Schnittstelle in die MCS eingefügt)
pETM-60	Kanamycin	(Dümmler et al., 2005)	Expression von NusA-6xHis-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> (Zur besseren Klonierung wurde eine NdeI Schnittstelle in die MCS eingefügt)
pRS426	Ampicillin, Ura3	(Sikorski and Hieter, 1989)	Klonierung von Konstrukten in <i>S. cerevisiae</i>
p123	Ampicillin, Carboxin	Laborsammlung	Konstitutive Expression von GFP-Fusionsproteinen in <i>Ustilago maydis</i>
p123-RFP	Ampicillin, Carboxin	Laborsammlung	Konstitutive Expression von RFP-Fusionsproteinen in <i>Ustilago maydis</i>
pCrg-GFP-Ala6-MXN-Cbx	Ampicillin, Carboxin	Laborsammlung	Überexpression von GFP-Fusionsproteinen in <i>Ustilago maydis</i>
pOtef-GFP-Ala6-MXN-Cbx	Ampicillin, Carboxin	Laborsammlung	Konstitutive Expression von GFP-Fusionsproteinen in <i>Ustilago maydis</i>
pOtef-Myc-Ala6-MXN-Cbx	Ampicillin, Carboxin	Laborsammlung	Konstitutive Expression von Myc-Fusionsproteinen in <i>Ustilago maydis</i>
pOtef-3xHA-Ala6-MXN-Cbx	Ampicillin, Carboxin	Laborsammlung	Konstitutive Expression von 3xHA-Fusionsproteinen in <i>Ustilago maydis</i>
pRU11	Ampicillin, Carboxin	Laborsammlung	Überexpression von Proteinen unter der Kontrolle des <i>crg</i> Promotors
pRU2	Ampicillin, Carboxin	Laborsammlung	Überexpression von Proteinen unter der Kontrolle des <i>nar</i> Promotors
pMF1C	Ampicillin, Carboxin	(Brachmann et al., 2004)	Enthält die SfiI-Cbx ^R Kasette
pMF1H	Ampicillin, Hygromycin	(Brachmann et al., 2004)	Enthält die SfiI-Hyg ^R Kasette
pMF1N	Ampicillin, Nourseotricin	(Brachmann et al., 2004)	Enthält die SfiI-Nat ^R Kasette
pMF1P	Ampicillin, Phleomycin	(Brachmann et al., 2004)	Enthält die SfiI-Phleo ^R Kasette
pMF2-1H	Ampicillin, Hygromycin	(Brachmann et al., 2004)	Enthält die SfiI-Hyg ^R -P ^{crg} Kasette
pMF2-1N	Ampicillin, Nourseotricin	(Brachmann et al., 2004)	Enthält die SfiI-Nat ^R -P ^{crg} Kasette
pMF2-1P	Ampicillin, Phleomycin	(Brachmann et al., 2004)	Enthält die SfiI-Phleo ^R -P ^{crg} Kasette

Name	Resistenz	Herkunft	Verwendung
pMF5-1H	Ampicillin, Hygromycin	(Brachmann et al., 2004)	Enthält die SfiI-GFP-TNOS-Hyg ^R Kasette
pHA-1H	Ampicillin, Hygromycin	AG Kahmann (MPI Marburg)	Enthält die SfiI-3xHA-Hyg ^R Kasette
pHA-1N	Ampicillin, Nourseotricin	AG Kahmann (MPI Marburg)	Enthält die SfiI-3xHA-Nat ^R Kasette

4.3 Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten *U. maydis* Stämme

4.3.1 Ektopische Expression von GFP-, RFP-, Myc- und 3xHA-Fusionsproteinen im *ip* Locus und im *nar1* Locus von *Ustilago maydis*

Zur ektopischen konstitutiven Expression von C-terminalen Fusionsproteinen, wurde das zu markierende Gen wahlweise in die SmaI Schnittstelle, oder zwischen die SmaI und die NcoI Schnittstelle der Plasmide pOtef-GFP-Ala6-MXN-Cbx (Cdc24-GFP, Cla4-GFP) oder p123-RFP (Cla4-RFP) ligiert. Zur konstitutiven Expression von N-terminalen Fusionsproteinen, wurden die Gene zwischen die MluI oder SacII und die NotI Schnittstelle der Plasmide pOtef-GFP-Ala6-MXN-Cbx (GFP-Rdi1, GFP-Bem1), pOtef-Myc-Ala6-MXN-Cbx (Myc-Bem1) und pOtef-3xHA-Ala6-MXN-Cbx (3xHA-Fusionen der GAP-Domänen von Rip1, Bem2 und Bem3) ligiert. Die Plasmide wurden durch Inkubation mit SspI innerhalb der Carboxin-Resistenz linearisiert und in *U. maydis* eingebracht. Die korrekte Integration durch homologe Rekombination in den *ip* Locus, wurde mittels Kontroll-PCR überprüft. Der *ip*-Locus von *U. maydis* kodiert für die Eisen-Schwefel-Untereinheit der Sukzinat-Dehydrogenase. Ein Aminosäureaustausch an Position 257 von Histidin nach Leucin führt dazu, dass der Organismus eine Resistenz gegen das Fungizid Carboxin entwickelt. Neben der gewünschten ortsspezifischen Integration durch homologe Rekombination, kann es aber auch zu anderen Integrationsereignissen kommen. Mit den folgenden Primerkombinationen können richtige Transformanten bestimmt werden:

- Primerkombination 1:** MB766 und MB767
Annealingtemperatur: 62°C
- Primerkombination 2:** MB768 und MB769
Annealingtemperatur: 64°C
- Primerkombination 3:** MB767 und MB769
Annealingtemperatur: 62°C

Dabei paart der Primer MB767 mit der genomischen Sequenz oberhalb des *ip*-Locus, der Primer MB768 mit der Vektorsequenz oberhalb des vom Vektor codierten, Resistenz vermittelnden Allels, der Primer MB766 mit dem Resistenz-vermittelnden Allel im Bereich der Mutation und MB769 mit dem Wildtyp-Allel im gleichen Bereich. Bei richtiger Integration liefern die Primerkombinationen 1 und 2 ein ca. 1,5 kb großes Fragment, nicht jedoch die Kombination 3.

Zur Integration in den *nar1* locus wurden 1000bp lange Bereiche oberhalb und unterhalb des *nar1*

4 Material und Methoden

Gens durch PCR amplifiziert. Mit Hilfe des Enzyms SmaI wurden stumpfe Enden generiert. Die linke Flanke wurde zwischen die SspI und die PvuII Schnittstelle oberhalb des *otef* Promotors des Plasmides pOtef-*cdc24*-GFP-Ala6-MXN-Cbx ligiert und die rechte in die EcoRV Schnittstelle unterhalb von GFP. Eine den Terminator TNOS und die Hygromycinresistenz enthaltende Kasette wurde zwischen GFP und rechte Flanke zwischen die AfII und NotI Schnittstelle ligiert. Das Konstrukt wurde durch einen SmaI-Verdau linearisiert und durch homologe Rekombination in den *nar1* Locus integriert, wobei *nar1* deletiert wurde. Die Abwesenheit des Genproduktes, der Nitratreduktase1, ermöglichte die Selektion positiver Klone durch mangelndes Wachstum auf Nitrat. Positive Klone wurden mittels „Southern Blot“ bestätigt.

Verwendete Oligos:

Name	Verwendung	Sequenz
MB766	PCR-Kontrolle der richtigen Integration in den <i>ip</i> -Locus	GAGCAGTTCATGATGGTAAG
MB767	PCR-Kontrolle der richtigen Integration in den <i>ip</i> -Locus	TTCGAGCTGGTTGCCTGC
MB768	PCR-Kontrolle der richtigen Integration in den <i>ip</i> -Locus	CTATGCGGCATCAGAGCAG
MB769	PCR-Kontrolle der richtigen Integration in den <i>ip</i> -Locus	GAGCAGTTCATGATGGTGTG
MD637	Amplifikation der linken Flanke des <i>nar1</i> Locus mit einer SmaI Schnittstelle am 5' Ende	gcatCCCGGGcaccgcgttcacgcgtctcg
MD638	Amplifikation der linken Flanke des <i>nar1</i> Locus mit einer SmaI Schnittstelle am 3' Ende	gcatCCCGGGcctaactgctcgtgtggtgg
MD639	Amplifikation der rechten Flanke des <i>nar1</i> Locus mit einer SmaI Schnittstelle am 5' Ende	gcatCCCGGGcgtgactgtaagttatggcgc
MD640	Amplifikation der rechten Flanke des <i>nar1</i> Locus mit einer SmaI Schnittstelle am 3' Ende	gcatCCCGGGccaagctttccaaatctacgg
MC407	Amplifikation von <i>cdc24</i> mit einer KpnI und einer SmaI Schnittstelle am 5' Ende	CCGGGTACCCCCGGGACCATGGCTGCTTCCACATCG
MC408	Amplifikation von <i>cdc24</i> mit einer NotI und einer SmaI Schnittstelle am 3' Ende (ohne Stopcodon)	CTGGCGGCCGCCTACCCGGGGTTGACGACCAACTC
ME952	Amplifikation von <i>cdc24</i> mit einer EheI Schnittstelle am 5' Ende	CGATggcgccATGGCTGCTTCCACATCGCTTGC
ME953	Amplifikation von <i>cdc24</i> mit einer EheI Schnittstelle am 3' Ende (ohne Stopcodon)	CGATggcgccGTTGACGACCAACTCGACTTCG
MF554	Amplifikation von <i>rdi1</i> mit einer MluI und einer SmaI Schnittstelle am 5' Ende	GCATacgegtGcccggaATGTCGCATGCACAGGATCCCACCATTTGG

4 Material und Methoden

Name	Verwendung	Sequenz
MF555	Amplifikation von <i>rdi1</i> mit einer SmaI und einer NotI Schnittstelle am 3' Ende (ohne Stopcodon)	CGATgcgccgcTTAccgggCCAGTCCTTGGCGATCTTGAAAGCCCACTC
MF144	Amplifikation der GAP-Domäne von <i>bem3</i> mit einer MluI Schnittstelle am 5' Ende	CGATacgcgtgTCGATTGCGATCTCCAGCATCCACG
MF145	Amplifikation der GAP-Domäne von <i>bem3</i> mit einer NotI Schnittstelle am 3' Ende	CGATgcgccgcGTTGTACAACGAGCTGTTTCGCTTG
MF146	Amplifikation der GAP-Domäne von <i>bem2</i> mit einer SacII Schnittstelle am 5' Ende	CGATtgccateCGGTTGGGGGAGCTCGTAGAGCGCG
MF147	Amplifikation der GAP-Domäne von <i>bem2</i> mit einer NotI Schnittstelle am 3' Ende	GCATgcgccgcCTCTGGCTCTGGCTCTGGCTC
MF148	Amplifikation der GAP-Domäne von <i>rip1</i> mit einer MluI Schnittstelle am 5' Ende	CGATtgccateCTCACTGTACCGTATCGCCTTCG
MF149	Amplifikation der GAP-Domäne von <i>rip1</i> mit einer NotII Schnittstelle am 3' Ende	CGATgcgccgcCGGTGCGCCTGCCGTCTTGAGATC
ME114	Amplifikation von <i>cla4</i> mit einer SmaI und einer NdeI Schnittstelle am 5' Ende	GCATcccgggcatATGTCTGGCTTTCGTGGCACG
ME115	Amplifikation von <i>cla4</i> mit einer NcoI und einer NotI Schnittstelle am 3' Ende (ohne Stopcodon)	CGATgcgccgcatgggACGATCGGGCTTGTTGCGGAAGCGG
MD889	Amplifikation von <i>bem1</i> mit einer MluI Schnittstelle am 5' Ende	CGATacgcgtcATGAAGGGTCTCAAAGATTTTCGC
MD890	Amplifikation von <i>bem1</i> mit einer NotI Schnittstelle am 3' Ende	GCTAgcgccgcCTAGGAAGCATGGAGCATGAACCTCC
MF204	Amplifikation von <i>smuI</i> mit einer MluI und einer SmaI Schnittstelle am 5' Ende	CGATACGCGTGCCCGGGATGCATCCATCACCCTAAGCGATCGGTGATC
MF205	Amplifikation von <i>smuI</i> mit einer SmaI und einer NotI Schnittstelle am 5' Ende (ohne Stopcodon)	GCATGCGGCCGCCTACCCGGGCGACTTGCGCGTCTGTTCACGCGCCGCC

Die Sequenz der Oligos ist jeweils in 5'-3' Richtung angegeben.

4.3.2 Ektopische Überexpression von Genen im *ip* Locus von *U. maydis*

Zur ektopischen Überexpression von Genen unter der Kontrolle von induzierbaren Promotoren wurden die Plasmide pRU11 (Arabinose induzierbarer *crg* Promotor) und pRU2 (Nitrat induzierbarer *nar*

4 Material und Methoden

Promotor) verwendet. Die PCR-amplifizierten Gene wurden zwischen die NdeI und die NotI Schnittstelle der Vektoren ligiert. Die Integration in den *ip* Locus und die Integrationskontrolle erfolgte wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben.

Verwendete Oligos:

Name	Verwendung	Sequenz
MF486	Amplifikation von <i>cdc24</i> mit einer NdeI Schnittstelle am 5' Ende	GCATcatATGGCTGCTTCCACATCGCTTGCG
MF489	Amplifikation von <i>cdc24</i> mit einer NotI Schnittstelle am 3' Ende	CGATgcgccgcCTAGTTGACGACCAACTCGACTTCGC
MF484	Amplifikation von <i>bem1</i> mit einer NdeI Schnittstelle am 5' Ende	gcatcatATGAAGGGTCTCAAAGATTTTCGCAGG
MF485	Amplifikation von <i>bem1</i> mit einer NotI Schnittstelle am 3' Ende	cgatgcgccgcCTAGGAAGCATGGAGCATGAACTTCC
MF553	Amplifikation von <i>rdi1</i> mit einer NdeI Schnittstelle am 5' Ende	ATCGcatATGTGCGCATGCACAGGATCCCACCA TTGG
MF555	Amplifikation von <i>rdi1</i> mit einer NotI Schnittstelle am 3' Ende	CGATgcgccgcTTAccgggCCAGTCCTTGGCGATCTTGAAAGCCCACTC
MF592	Amplifikation von <i>cdc42</i> mit einer NdeI Schnittstelle am 5' Ende	GCATcatATGCAGACCATCAAGTGTGTCTCGTCGTCGG
MF593	Amplifikation von <i>cdc42</i> mit einer NotI Schnittstelle am 3' Ende	GCATgcgccgcTCAGAGAATGGCGCACTTGGACTTCTTGCG
MB479	Amplifikation von <i>rac1</i> mit einer NdeI Schnittstelle am 5' Ende	CGATcatATGCAGACCATCAAGTGTGTAGTCG
MF151	Amplifikation von <i>rac1</i> mit einer NotI Schnittstelle am 3' Ende	GCATgcgccgcTTAAAGAATCATACAGTTGTCTTCTTCTTAC

Die Sequenz der Oligos ist jeweils in 5'-3' Richtung angegeben.

4.3.3 Herstellung von Deletionsmutanten in *Ustilago maydis*

Die Deletionskonstrukte wurden unter Gebrauch eines Resistenzkassettensystems, das speziell für *U. maydis* konzipiert ist, hergestellt (Brachmann et al., 2004). Dabei wurden 1000bp lange Bereiche oberhalb und unterhalb des zu deletierenden Gens durch PCR amplifiziert. Der rückwärtsgerichtete Primer der linken Flanke und der vorwärtsgerichtete Primer der rechten Flanke des zu deletierenden Gens, waren mit einer Sfi I Schnittstelle versehen. Das Enzym schneidet an Stellen der Sequenz GGCCNNNNNGGCC. Dabei waren die fünf Nukleotide zwischen den GGCC-Flanken der Schnittstelle am 3'-Ende der linken Flanke (Sfi_{up}) und am 5'-Ende der rechten Flanke (Sfi_{down}) unterschiedlich. Zwischen die Flanken wurde eine Resistenzkassette mit der zum 3'-Ende der linken Flanke passenden Sfi I Schnittstelle am 5'-Ende und der zum 5'-Ende der rechten Flanke passenden SfiI Schnittstelle am 3'-Ende, ligiert.

Zur Herstellung der Deletionskonstrukte wurde das effektive Rekombinationssystem der Bäckerhefe *S. cerevisiae* genutzt. Hierzu wurden an das 5' Ende der linken Flanke und an das 3' Ende der rechten Flanke ein 30 bp langer, zu dem Plasmid pRS426 homologer, Bereich angehängt. Die zu dem Vektor homologen Bereiche waren dabei durch eine SspI Schnittstelle von dem Flankenende getrennt. Ein zu der Resistenzkassette homologer 30 bp langer Bereich am 3' Ende der linken und am 5' Ende der

4 Material und Methoden

rechten Flanke, diente der Integration der Resistenzkassette. 500 ng der linken Flanke, der rechten Flanke und der mit SfiI linearisierten Resistenzkassette wurden mit 25ng des mit KpnI und BamHI linearisierten Vektors gemischt und in Hefezellen transformiert. Die aus der Hefe isolierten und in *E. coli* vermehrten Konstrukte, wurden anhand der zwei SspI Schnittstellen linearisiert und in *U. maydis* Protoplasten eingebracht. Die korrekte Integration durch homologe Rekombination wurde in einem „Southern Blot“ bestätigt.

verwendete Oligos:

Name	Verwendung	Sequenz
MF450	Amplifikation der linken Flanke von <i>cdc24</i> mit einer SspI Schnittstelle am 5' Ende	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGaatATTT-CACCTCGGCTTGCTTTCTCTCCCTATCGGCG
MF451	Amplifikation der linken Flanke von <i>cdc24</i> mit einer SfiI _{up} Schnittstelle am 3' Ende	gcaattgtcacgccatggtggccatctaggccGATGAATTGTCTATG-GCAGAGCTAGCCGAATC
ME501	Amplifikation der rechten Flanke von <i>cdc24</i> mit einer SfiI _{down} Schnittstelle am 5' Ende	AAGCTGTGCGGCCGCATTAATAGGCCTGAGTGGCC-CTCTCCCCCTGTATTTGTACCTTGCATCCATTCC
MF299	Amplifikation der rechten Flanke von <i>cdc24</i> mit einer SspI Schnittstelle am 3' Ende	GCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGCaatATTT-GGGCTCGAACATGCCGCAACAGTGGCGACC
SF001	Amplifikation der linken Flanke von <i>cla4</i> mit einer SspI Schnittstelle am 5' Ende	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGaatATTC-AGTTGTCGTTGCGTGAGATCCAGGGCG
SF002	Amplifikation der linken Flanke von <i>cla4</i> mit einer SfiI _{up} Schnittstelle am 3' Ende	gcaattgtcacgccatggtggccatctaggccTGTTGCAGACGCTGT-CTGATGGCGCTCGTTTG
SF003	Amplifikation der rechten Flanke von <i>cla4</i> mit einer SfiI _{down} Schnittstelle am 5' Ende	ggagtgcggccgcattaataggcctgagtggccAGCAGGTGCACTCC-CTTCCCTTTTCATGTATG
SF004	Amplifikation der rechten Flanke von <i>cla4</i> mit einer SspI Schnittstelle am 3' Ende	GCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGCaatATTG-AGTCTAGTCGGGTCAATCAACTTGCCG
MF556	Amplifikation der linken Flanke von <i>rdi1</i> mit einer SspI Schnittstelle am 5' Ende	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGaatATTG-CAGCCTTATTGCGAGCTCAACTGCAAATGG
MF557	Amplifikation der linken Flanke von <i>rdi1</i> mit einer SfiI _{up} Schnittstelle am 3' Ende	cgcaattgtcacgccatggtggccatctaggccGATGACGAAGGCAC-TTTTGCTGCTATAGCAGGGACG
MF558	Amplifikation der rechten Flanke von <i>rdi1</i> mit einer SfiI _{down} Schnittstelle am 5' Ende	gctgtgcggccgcattaataggcctgagtggccAAACTTTCGCTCC-GGCCCCGCTTCGCTGCTTCATATC
MF559	Amplifikation der rechten Flanke von <i>rdi1</i> mit einer SspI Schnittstelle am 3' Ende	GCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGCaatATTC-ATGCTCTACTTCTCTGCCCTACCCCCATTATC

Die Sequenz der Oligos ist jeweils in 5'-3' Richtung angegeben.

4.3.4 Herstellung konditionaler Mutanten

Die Konstrukte zur Herstellung konditionaler Mutanten, die das jeweilige Gen unter der Kontrolle des induzierbaren *crp* Promotors exprimieren, sind mit denen zur Deletion von Genen vergleichbar. Jedoch beinhaltet die SfiI-Kassette am 3' Ende des Resistenzmarkers den induzierbaren Promotor und wird über die SfiI_{down} Schnittstelle an das 5' Ende einer zu den ersten 1000 bp des ORFs homologen Flanke ligiert. Die Konstrukte wurden in pJet2.1 (*cdc24* und *rip1*), pUC18 (*bem1*) und pRS426 (*rdi1*) vermehrt.

Verwendete Oligos:

Name	Verwendung	Sequenz
MC523	Amplifikation der linken Flanke von <i>cdc24</i> mit einer PstI Schnittstelle am 5' Ende	CGCTGCAGTCGCTGCTGCCTCTCCGT
MC524	Amplifikation der linken Flanke von <i>cdc24</i> mit einer SfiI _{up} Schnittstelle am 3' Ende	GCGGCCATCTAGGCCCGGACCTGAACGCAAGCG
MC525	Amplifikation der ORF Flanke von <i>cdc24</i> einer SfiI _{down} Schnittstelle am 5' Ende	GCGGCCTGAGTGGCCATGGCTGCTTCCACATCG
MC526	Amplifikation der ORF Flanke von <i>cdc24</i> einer PstI Schnittstelle am 3' Ende	GCGGTACCAACGTTTTCTTCGACA
MD583	Amplifikation der linken Flanke von <i>bem1</i> mit einer SfiI Schnittstelle am 5' Ende	GCATggcctagatggccCACGCACAGATACGCCTGCATC
MD584	Amplifikation der linken Flanke von <i>bem1</i> mit einer SfiI _{up} Schnittstelle am 3' Ende	GCATggccatctaggccGATGGGCCAATCGCGGTAATGTG-C
MD585	Amplifikation der ORF Flanke von <i>bem1</i> einer SfiI _{down} Schnittstelle am 5' Ende	GCATggcctgagtggccATGAAGGGTCTCAAAGATTTTCG
MD586	Amplifikation der ORF Flanke von <i>bem1</i> einer SfiI Schnittstelle am 3' Ende	GCATggccactcaggccGCATAGCACCGGCCAGAGACCC
MF556	Amplifikation der linken Flanke von <i>rdi1</i> mit einer SspI Schnittstelle am 5' Ende	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGaatATTG-CAGCCTTATTGCGAGCTCAACTGCAAATGG
MF557	Amplifikation der linken Flanke von <i>rdi1</i> mit einer SfiI _{up} Schnittstelle am 3' Ende	cgcaattgtcacgccatggtggccatctaggccGATGACGAAGGCAC-TTTTGCTGCTATAGCAGGGACG
MF560	Amplifikation der ORF Flanke von <i>rdi1</i> einer SfiI _{down} Schnittstelle am 5' Ende	ccaaaaaagataccataataggcctgagtggccATGTCGCATGCACAGGATCCCACCATTTGGCGACGAC

Name	Verwendung	Sequenz
MF561	Amplifikation der ORF Flanke von <i>rdi1</i> einer SspI Schnittstelle am 3' Ende	GCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGCaatATTG-GGAACCTTGCATTGCGTAGAGTACGAGAAGTATTG
ME814	Amplifikation der linken Flanke von <i>rip1</i> mit einer SspI Schnittstelle am 5' Ende	GCATaatATTGCGGTGTGCTACTCACGC
ME246	Amplifikation der linken Flanke von <i>rip1</i> mit einer Sfi _{up} Schnittstelle am 3' Ende	TGAGGCCATCTAGGCCGTTGCTCTCGCCGTGATGTGGG
ME816	Amplifikation der ORF Flanke von <i>rip1</i> einer Sfi _{down} Schnittstelle am 5' Ende	GCATggcctgagtggccATGGACACGCTCTCCGCTGGG
ME817	Amplifikation der ORF Flanke von <i>rip1</i> einer SspI Schnittstelle am 3' Ende	GCTAaatATTTGAATACATCGAAAAAGTTGG

Die Sequenz der Oligos ist jeweils in 5'-3' Richtung angegeben.

4.3.5 Konstrukte zur Herstellung N- und C-terminaler 3xHA-Fusionen am genomischen Locus

Die Konstrukte zur Herstellung von C-terminalen 3xHA-Fusionen am genomischen Locus bestanden aus einer mindestens 1000 bp langen, zum 3' Ende des ORFs homologen Flanke gefolgt, von einer 3xHA-Hygromycin^R SfiI-Kassette und der 1000 bp langen rechten Flanke. Das Stopcodon am 3' Ende der ORF-Flanke wurde deletiert und die Sfi_{Fus} Schnittstelle so angehängt, dass das 3xHA-Protein im richtigen Leserahmen lag. Die Konstrukte wurden nach dem selben Verfahren wie die Deletionskonstrukte in der Hefe im Vektor pRS426 assembliert und anschließend in *E. coli* vermehrt. Linearisiert wurde über die SspI Schnittstelle am 5' Ende der ORF- und am 3' Ende der rechten Flanke.

Zur Herstellung einer N-terminalen 3xHA-*rac1* Fusion am genomischen Locus, wurden zwei komplementäre, für das 3xHA-Protein codierende Oligos aneinandergelagert und zwischen die NcoI und die SacII Schnittstelle des Vektors pOtef-GFP-*rac1*-Ala6-MXN-Cbx ligiert. Anschließend wurde die linke Flanke von *rac1* zwischen die KpnI und die NcoI Schnittstelle des Plasmides ligiert, wobei der *otef* Promotor deletiert wurde. Eine TNOS-Hygromycin^R Kassette wurde unterhalb von *Rac1* zwischen die AflII und die NotI Schnittstelle ligiert. Die rechte Flanke von *rac1* wurde mit Hilfe der Enzyme HpaI (5' Ende) und SmaI (3' Ende) abgestumpft und in die ebenfalls stumpfe HpaI Schnittstelle des Vektors ligiert. Das Konstrukt wurde mit Hilfe von KpnI und HpaI linearisiert und in *U. maydis* Zellen eingebracht.

Verwendete Oligos:

Name	Verwendung	Sequenz
MF301	Amplifikation der ORF Flanke von <i>cdc24</i> mit einer SspI Schnittstelle am 5' Ende	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGaattATTC-GTCTACCACCGCGTCCATGGCCAGCAGCTCG

Name	Verwendung	Sequenz
MF300	Amplifikation der ORF Flanke von <i>cdc24</i> mit einer Sfi _{Fus} Schnittstelle am 3'Ende (ohne Stopcodon)	cgggcacgtcgtaggggtaggcccgttgccccGTTGACGACCAAC-TCGACTTCGCCGCGCGGGC
ME501	Amplifikation der rechten Flanke von <i>cdc24</i> mit einer Sfi _{down} Schnittstelle am 5'Ende	AAGCTGTGCGGCCCGCATTAAATAGGCCTGAGTGGCC-CTCTCCCCTGTATTTGTACCTTGCATCCATTCC
MF299	Amplifikation der rechten Flanke von <i>cdc24</i> mit einer SspI Schnittstelle am 3'Ende	GCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGCaatATTT-GGGCTCGAACATGCCGCAACAGTGGCGACC
ME834	Oligo zur Einführung eines 3xHA Proteins (fwd)	catggccTACCCCTACGACGTGCCCCGACTATGCCGGTG-CCGCCTACCCCTACGACGTGCCCCGATTACTCGGCT-GGTGGTTACCCCTACGACGTGCCCCGACTATgccgc
ME834	Oligo zur Einführung eines 3xHA Proteins (rev)	ggcATAGTCGGGCACGTCGTAGGGGTAACCACCAGC-CGAGTAATCGGGCACGTCGTAGGGGTAGGCGGCAC-CGGCATAGTCGGGCACGTCGTAGGGGTAggc
ME836	Amplifikation der rechten Flanke von <i>rac1</i> mit einer Sfi _{down} und einer SmaI Schnittstelle am 5'Ende	GCATccccgggcctgagtggccGAGTGAAACGCGAACACGCA-GATGG
ME837	Amplifikation der rechten Flanke von <i>rac1</i> mit einer HpaI Schnittstelle am 3'Ende	CGATgttaacGAATCTGTACGAAGACGGCAAAG
ME838	Amplifikation der linken Flanke von <i>rac1</i> mit einer KpnI Schnittstelle am 5'Ende	GCATggtaccCCCCTGTGCACATGTGCTGGTACAG
ME839	Amplifikation der linken Flanke von <i>rac1</i> mit einer NcoI Schnittstelle am 3'Ende	CGATccatggGATTGCGAGTGTGAATACGAGAGCGC

Die Sequenz der Oligos ist jeweils in 5'-3' Richtung angegeben.

4.3.6 Konstruktion des Testsystems zur Identifikation des für den Cdc24-Abbau ausreichenden Fragments

Zur Herstellung der N-terminalen SH3-Fusionsproteine wurde zunächst die zweite SH3-Domäne von Bem1 amplifiziert und das 5'Ende mit EheI und das 3'Ende mit SmaI abgestumpft. Bei der anschließenden Ligation in die SmaI Schnittstelle oberhalb von GFP in pOtef-GFP-Ala6-MXN-Cbx wurde am 3'Ende die SmaI Schnittstelle erhalten, in die nachfolgend die *cdc24* Fragmente ligiert wurden. Abbildung 4.1 A zeigt eine Übersicht der amplifizierten *cdc24* Fragmente.

In das Plasmid Pru11*cla4*Δ*CRIB* (Leveleki et al., 2004) wurde eine TNOS-Hygromycin Kasette zwischen die AflII und die NotI Schnittstelle integriert. Das Plasmid wurde mit HpaI linearisiert und zufällig in das Genom von Bub8Δ*rac1* (Mahlert et al., 2006) integriert. In den so erhaltenen Stamm wurden die Plasmide mit den *cdc24* Fragmenten in den *ip* Locus integriert.

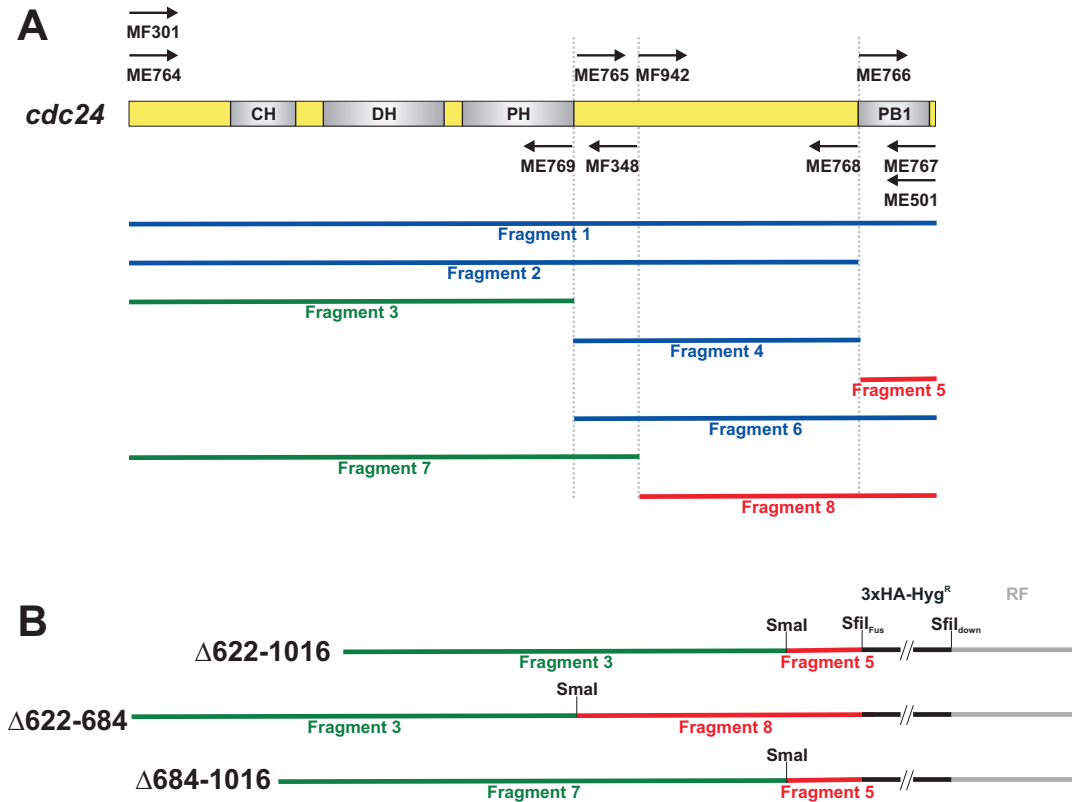


Abbildung 4.1: Fragmentierung von *cdc24* und Herstellung der Konstrukte zur Deletion einzelner Bereiche. **A)** Schematische Darstellung der durch PCR mit den eingezeichneten Oligos amplifizierten *cdc24* Fragmente. **B)** Übersicht der zur Deletion interner Bereiche verwendeten Konstrukte. Die N-terminalen Fragmente (grün) wurden über eine *Sma*I Schnittstelle an die C-terminalen Fragmente (rot) ligiert. Die 3xHA-Hygromycin^R Kassetten und die rechte Flanke wurden durch Rekombination in *S. cerevisiae* angehängt.

Verwendete Oligos:

Name	Verwendung	Sequenz
ME761	Amplifikation der zweiten SH3-Domäne von Bem1 mit einer <i>Ehe</i> I Schnittstelle und einem ATG am 5' Ende	GCATggcgccATGCTCTACGCCGTGGTCAAGTACG
ME763	Amplifikation der zweiten SH3-Domäne von Bem1 mit einer <i>Sma</i> I Schnittstelle 3' Ende	CGATcccgggATCACGGATCTCGACAAAGGCAACAGG
ME764	Amplifikation der Cdc24 Fragmente 1, 2, 3 und 7 mit einer <i>Sma</i> I Schnittstelle am 5' Ende	CGATcccgggATGGCTGCTTCCACATCGCTTGC
ME765	Amplifikation der Cdc24 Fragmente 4 und 6 mit einer <i>Sma</i> I Schnittstelle am 5' Ende	GCATcccgggAACATGCGACGACAGCAGGCAGC
ME766	Amplifikation des Cdc24 Fragments 5 mit einer <i>Sma</i> I Schnittstelle am 5' Ende	GCATcccgggGCCATCAAACATCAACATCAGC

Name	Verwendung	Sequenz
MF942	Amplifikation des Cdc24 Fragments 8 mit einer SmaI Schnittstelle am 5' Ende	CGATcccgggatgTCGCGCACGCAGAGTCAGGC-GAGC
ME767	Amplifikation der Cdc24 Fragmente 1, 5, 6 und 8 mit einer SmaI Schnittstelle am 3' Ende	GCATcccgggGTTGACGACCAACTCGACTTCGC
ME768	Amplifikation der Cdc24 Fragmente 2 und 4 mit einer SmaI Schnittstelle am 3' Ende	CGATcccgggCGAGGACGGGGTGAAGCCG
ME769	Amplifikation des Cdc24 Fragments 3 mit einer SmaI Schnittstelle am 3' Ende	CGATcccgggGACTTCGTTCGATGAGCTTGTTAA-TGGC
MF348	Amplifikation des Cdc24 Fragments 7 mit einer SmaI Schnittstelle am 3' Ende	GCATCCCGGGAAGAGCCGAGTGTGGCAGGA-CAGCAGTCG

Die Sequenz der Oligos ist jeweils in 5'-3' Richtung angegeben. Die Oligos dienen der N-terminalen Fusion an die SH3-Domäne von Bem1. Für die Expression ohne SH3-Domäne wurden in ME765 und ME766 hinter der SmaI Schnittstelle ein ATG eingefügt und diese mit ME765b und ME766b benannt.

4.3.7 Konstrukte zur Deletion von einzelnen Bereichen innerhalb eines ORFs

Zur Deletion einzelner Bereiche innerhalb von *cdc24* wurden ein N-terminales Fragment mit einer SmaI Schnittstelle am 3' Ende und ein C-terminales Fragment mit einer SmaI Schnittstelle am 5' Ende aneinander ligiert (Abb. 4.1 B). Die so erhaltene Flanke wurde an eine 3xHA-Hygromycin^R SfiI-Kassette ligiert, die mit der rechten Flanke von *cdc24* verbunden wurde. Zur Deletion der GAP Domäne von Bem2 wurde ein N-terminales Fragment, dessen 3' Ende vor dem, für die GAP-Domäne codierenden, Bereich lag, und ein C-terminales Fragment, dessen 5' Ende hinter dem GAP-Bereich lag, amplifiziert und über eine SacII Schnittstelle ligiert. Die so erhaltene Flanke wurde an eine Hygromycin Resistenzkassette fusioniert, die am 3' Ende an die rechte Flanke von *bem2* ligiert wurde. Die Assemblierung der Konstrukte erfolgte in *S. cerevisiae* und die Vermehrung in *E. coli*. Zur Transformation in *U. maydis* wurden die Konstrukte über zwei SspI Schnittstellen linearisiert.

Verwendete Oligos:

Name	Verwendung	Sequenz
MF301	Amplifikation der ORF Flanke von <i>cdc24</i> mit einer SspI Schnittstelle am 5' Ende	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGaatATTC-GTCTACCACCGCGTCCATGGCCAGCAGCTCG
MF300	Amplifikation der ORF Flanke von <i>cdc24</i> mit einer SfiI _{Fus} Schnittstelle am 3' Ende (ohne Stopcodon)	cgggcacgtcgtaggggtaggccggttgccccGTTGACGACCAACTCGACTTCGCCGCGGGGC
ME501	Amplifikation der rechten Flanke von <i>cdc24</i> mit einer SfiI _{down} Schnittstelle am 5' Ende	AAGCTGTGCGGCCGCATTAATAGGCCTGAGTGGCCCTCTCCCCCTGTATTTGTACCTTGATCCATTCC

Name	Verwendung	Sequenz
MF299	Amplifikation der rechten Flanke von <i>cdc24</i> mit einer SspI Schnittstelle am 3' Ende	GCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGCaatATTTGGGCTCGAACATGCCGCAACAGTGGCGACC
ME914	Amplifikation des N-terminalen Bereichs von <i>bem2</i> mit einer SspI Schnittstelle am 5' Ende	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGAATATTGGCTGGATCCTTGCCTGCCTGGCTGAAG
ME916	Amplifikation des N-terminalen Bereichs von <i>bem2</i> mit einer SacII Schnittstelle am 3' Ende	CTCTGGCTCTGGCTCTGGCTCAAAGAGCCAGCCCTCGCGCTCTACGAGCTCCCCCAACCG
ME917	Amplifikation des C-terminalen Bereichs von <i>bem2</i> mit einer SacII Schnittstelle am 5' Ende	CGGTTGGGGGAGCTCGTAGAGCGCGAGGGCTGGCTCTTTGAGCCAGAGCCAGAGCCAGAG
ME915	Amplifikation des C-terminalen Bereichs von <i>bem2</i> mit einer SfiI _{up} Schnittstelle am 3' Ende	ATTGTCACGCCATGGTGGCCATCTAGGCCGGCATCGCCGGCTTGGCCTCGTCGCTGGAG
MD820	Amplifikation der rechten Flanke von <i>bem2</i> mit einer SfiI _{down} Schnittstelle am 5' Ende	GTGCGGCCGCATTAATAGGCCTGAGTGGCCAATCCATCCAGACACGCTGCTAGGTTCTCA
MD821	Amplifikation der rechten Flanke von <i>bem2</i> mit einer SspI Schnittstelle am 3' Ende	GCGGATAACAATTTTCACACAGGAAACAGCAATATTGTTCTCTTACCTCGGTGGACC

Die Sequenz der Oligos ist jeweils in 5'-3' Richtung angegeben.

4.3.8 Einführung von Punktmutationen

Zur Einführung von Punktmutationen wurden Oligos konzipiert, die das mutierte Codon beidseitig flankiert von mindestens 10 Basen enthielten. Die Mutagenese von *cdc24* und *cla4* erfolgte am genomischen Locus. Dazu wurde ein die Mutation enthaltendes Oligo am 3' Ende des N-terminalen Fragments und am 5' Ende des C-terminalen Fragments zur Amplifikation eingesetzt. In *S. cerevisiae* wurden dann N- und C-terminales Fragment mit der 3xHA-Hygromycin^R Kasette und der rechten Flanke des Genes in dem Vektor pRS426 rekombinatorisch zusammengesetzt. Zur Herstellung der Mutante *cdc24*^{*} wurden Oligos verwendet, die ausser der Mutation S635A alle anderen abdeckten (MF394: T654AT656AS657AS658A; MF395: T675AT676AT682A). *cdc24*^{5635A} diente als Grundlage für die Amplifikation des N- und C-terminalen Fragments von Cdc24^{*}.

Zur Mutagenese von *rac1* und *cla4ΔCRIB* wurde mit Hilfe von zwei komplementären, die Mutation tragenden, Oligos das ganze Plasmid (pRU11-*rac1*, pRU11-*cla4ΔCRIB*-TNOS-Hyg^R, pGEX-*rac1* oder pETM-60-*rac1*) amplifiziert und das ursprüngliche, nicht mutierte Plasmid, durch das methylierungsabhängige Restriktionsenzym DpnI abgebaut. Die Plasmide wurden in *E. coli* vermehrt, sequenziert und in das Genom von *U. maydis* integriert. Die einzige Ausnahme bildete hier *rac1*^{F28L}, da diese Mutation in das vorwärtsgerichtete Oligo zur Amplifikation des ORFs eingefügt wurde. Anschließend wurde *rac1*^{F28L} zwischen die NdeI und die NotI Schnittstelle von pRU11 ligiert.

Verwendete Oligos:

4 Material und Methoden

Name	Verwendung	Sequenz
MD013	Einführung der T285A Punktmutation in <i>cdc24</i> (fwd)	GAGCTTCTCACCGCGGAGCGCAAATAC
MD014	Einführung der T285A Punktmutation in <i>cdc24</i> (rev)	GTATTGCGCTCCGCGGTGAGAAGCTC
MF303	Einführung der S635A Punktmutation in <i>cdc24</i> (fwd)	CGACGACAGCAGGCAGCtGCACAGCACTACgCCCA-GCAGCAACAAAACATGAATATGGCTGGT
MF302	Einführung der S635A Punktmutation in <i>cdc24</i> (rev)	ACCAGCCATATTTCATGTTTTGTTGCTGCTGGGcGTA-GTGCTGTGCaGCTGCCTGCTGTCGTCTG
MF305	Einführung der S657AS658A Punktmutationen in <i>cdc24</i> (fwd)	GGCGCAATGGGACGACGCATCACGCAGACCgcgCG-CATTTCCCACAGACGCCACTGGCCGAGATA
MF304	Einführung der S657AS658A Punktmutationen in <i>cdc24</i> (rev)	TATCTCGGCCAGTGGCGTCTGTGGGAAATGCGccgc-GGTCTGCGTGATGCGTCGTCCCATTGCGCC
MF307	Einführung der S682A Punktmutation in <i>cdc24</i> (fwd)	AACCCCTTCACGACTGCTGTCCTGCCgCAtgCGGCT-CTTTCGCGCACGCAGAGTCAGGCGAGC
MF306	Einführung der S682A Punktmutation in <i>cdc24</i> (rev)	GCTCGCCTGACTCTGCGTGCGCGAAAGAGCCGcaT-GcGGCAGGACAGCAGTCGTGAAGGGGTT
MF309	Einführung der T675AT676A Punktmutationen in <i>cdc24</i> (fwd)	CTGGCCGAGATAGCACCCGTCAACCCCTTCgCagCT-GCTGTCTGCCACACTCGGCTCTTTTCGCGC
MF308	Einführung der T675AT676A Punktmutationen in <i>cdc24</i> (rev)	GCGCGAAAGAGCCGAGTGTGGCAGGACAGCAGctG-cGAAGGGGTTGACGGGTGCTATCTCGGCCAG
MF311	Einführung der T654AT656A Punktmutationen in <i>cdc24</i> (fwd)	GCTGGTGCAGGCGCAATGGGACGACGCATCgCGC-AGgCgAGcTCGCATTTCCCACAGACGCCACTGGCC
MF310	Einführung der T654AT656A Punktmutationen in <i>cdc24</i> (rev)	GGCCAGTGGCGTCTGTGGGAAATGCGAgCTcGcCT-GCGcGATGCGTCGTCCCATTGCGCCTGCACCAGC
MF313	Einführung der T682A Punktmutation in <i>cdc24</i> (fwd)	ATCACGCAGACCAGTTCGCATTTCCCACAGgCGCC-ACTGGCCGAGATAGCACCCGTCAACCCC
MF312	Einführung der T682A Punktmutation in <i>cdc24</i> (rev)	GGGGTTGACGGGTGCTATCTCGGCCAGTGGCGcCT-GTGGGAAATGCGAACTGGTCTGCGTGAT
MF394	Mutation aller potentiellen Phosphorylierungsstellen, N-terminus rev	GGGGTTGACGGGTGCTATCTCGGCCAGTGGCGcCT-GTGGGAAATGCGcgcGGcCTGCGcGATGCGTCGTCC-CATTGCGCCTGCACCAGC
MF395	Mutation aller potentiellen Phosphorylierungsstellen, C-Terminus fwd	CTGGCCGAGATAGCACCCGTCAACCCCTTCgCagCT-GCTGTCTGCCACACgCGGCTCTTTTCGCGCACGCA-GAGTCAGGCGAGC
ME055	Einführung der M406LI407L Punktmutationen in <i>cdc24</i> (fwd)	CTACGAGCTGCCACCTTCTTACTAAAGCCCGTGC-AGCGCAT
ME056	Einführung der M406LI407L Punktmutationen in <i>cdc24</i> (rev)	GATGCGCTGCACGGGCTTTAGTAAGAAGGTGGGC-AGCTCGTAG
MF150	Amplifikation von <i>rac1</i> mit einer NdeI Schnittstelle und der F28L Mutation am 5' Ende	CGATcatATGCAGACCATCAAGTGTGTAGTCGTCTGG-AGACGGTGCCGTCGGAAAGACGTGTCTTCTTATCT-CGTATACAACCAACGCCTTaCCGGTAAGTTTGCGCG

Name	Verwendung	Sequenz
MF289	Einführung der Q61LR66E Mutationen in <i>rac1</i> (fwd)	GTCTCTCTCGGTCTCTGGGATACTGCGGGTCtAGA-AGACTACGACgaGTTAAGACCGCTCTCGTACCCGCA-AACCGAC
MF290	Einführung der Q61LR66E Mutationen in <i>rac1</i> (rev)	GTCGGTTTTCGGGTACGAGAGCGGTCTTAACtGT-CGTAGTCTTCTaGACCCGCAGTATCCCAGAGACCG-AGAGAGAC
ME176	Einführung der E91HN92H Mutationen in <i>rac1</i> (fwd)	TTCTCTCGTGTGCTTTTCACTGGTGAGTCCACCaaagc-TTCcAccACGTTCTGAACCAAGTGGTGGCCCGAAGTG-TCG
ME177	Einführung der E91HN92H Mutationen in <i>rac1</i> (rev)	CGACACTTCGGGCCACCACTTGGTTCTGAACGTggTg-GAAgcttGGTGGACTCACCAGTGAAAAGCACACGAG-GAA
ME118	Einführung der T17N Mutationen in <i>rac1</i> (fwd)	GGAGACGGTGCCGTCGGcAAGAacTGcCTTCTTATC-TCGTAT
ME118	Einführung der T17N Mutationen in <i>rac1</i> (rev)	ATACGAGATAAGAAGgCAgtTCTTgCCGACGGCACCGTCTCC
MB507	Einführung der Q61L Mutationen in <i>rac1</i> (fwd)	GGGATACTGCGGGTCTCGAGGACTACG
MB506	Einführung der Q61L Mutationen in <i>rac1</i> (rev)	CGTAGTCCTCGAGACCCGCAGTATC
MD949	Einführung der M629A Mutation in <i>cla4</i> (fwd)	CAACGAGCTCTGGGTCATCGCGGAGTACATGGAG-GGAGG
MD950	Einführung der M629A Mutation in <i>cla4</i> (rev)	CCTCCCTCCATGTACTCCGCGATGACCCAGAGCTC-GTTG

Die Sequenz der Oligos ist jeweils in 5'-3' Richtung angegeben.

4.3.9 Konstrukte zur Überexpression von *U. maydis* Proteinen in *E. coli*

Die zur Überexpression in *E. coli* verwendeten Plasmide wurden bis auf pETM-60-*rac1* und pGEX-*cdc24*DH-PH^{T682A} der Stammsammlung entnommen (pGEX-*rac1*, pGEX-*rac1*^{W56F}, pGEX-*cdc42* und pGEX-*cdc42*^{F56W}: (Hlubek et al., 2008); pGEX-*smu1*CRIB: (Schink and Bölker, 2009)). Zur Herstellung von pETM-60-*rac1* und pGEX-*cdc24*DH-PH^{T682A} wurde das entsprechende PCR-Produkt zwischen die NdeI und die NotI Schnittstelle der Vektoren kloniert.

Verwendete Oligos:

Name	Verwendung	Sequenz
MC892	Amplifikation des DH-PH Tandems aus <i>cdc24</i> mit einer NdeI Schnittstelle am 5' Ende	GAATTCCATATGGACCACCCTTCTGACGACCG
MC893	Amplifikation des DH-PH Tandems aus <i>cdc24</i> mit einer NotI Schnittstelle am 3' Ende	GGATCCGCGGCCGCGTTATGCCGCTGCCTGCTGT-CGTC

Name	Verwendung	Sequenz
MB479	Amplifikation von <i>rac1</i> mit einer NdeI Schnittstelle am 5' Ende	CGATcatATGCAGACCATCAAGTGTGTAGTCG
MF151	Amplifikation von <i>rac1</i> mit einer NotI Schnittstelle am 3' Ende	GCATgcgggccgcTTAAAGAATCATACAGTTGTTCTTCT-TCTTAC

Die Sequenz der Oligos ist jeweils in 5'-3' Richtung angegeben.

4.4 Methoden

4.4.1 Kultivierung von Mikroorganismen

Kultivierung von *Escherichia coli*

Flüssigkulturen von *Escherichia coli* wurden in autoklaviertem dYT-Medium unter aeroben Bedingungen bei 37°C angezogen. Das Medium wurde bei Bedarf mit 100 µg/ml Ampicillin, 30 µg/ml Kanamycin oder 20 µg/ml Chloramphenicol versetzt. Für die Anzucht auf Festmedium wurde dYT-Agar verwendet, der zur Selektion positiver Transformanden mit oben genannten Antibiotikakonzentrationen versetzt wurde. Zur Langzeitlagerung wurden dichtgewachsene *E. coli* Kulturen bis zu einer Konzentration von 15% (v/v) mit Glycerin gemischt und bei -80°C eingefroren.

dYT-Medium:	16 g/l Trypton	dYT-Agar:	dYT mit 2,0 % (w/v) Agar
	10 g/l Hefeextrakt		+/- 100 µg/ml Ampicillin
	5 g/l NaCl		
	+/- 100 µg/ml Ampicillin		

Kultivierung von *S. cerevisiae*

Flüssigkulturen von *S. cerevisiae* wurden in Synthetic-Complete-Medium (SC) unter aeroben Bedingungen bei 30°C angezogen. Die Selektion positiver Klone erfolgte auf SC-Festmedium, dem im Falle einer Transformation mit pRS426 kein Uracil beigemischt wurde.

Synthetic-Complete-Medium (1 l):	1,7 g Yeast Nitrogen Base
	1,47 g Dropout-Mix
	20 g Glukose
Je nach Selektionsmarker:	0,4 g L-Histidin
	0,4 g L-Histidin
	0,1 g Adenin
	0,4 g Tryptophan
	0,8 g Leucin
	0,4 g Uracil

Dropout-Mix: Je 2.0 g Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Asparagin, Cystein, Glutaminsäure, Glutamin, Glycin, Inositol, Isoleucin, Lysin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin, Valin und 0.2 g para-Aminobenzoesäure. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 5,6 eingestellt. Anschließend wurde das Medium für 20 min bei 121°C autoklaviert. Methionin und Glukose wurden erst nach dem Autoklavieren als sterilfiltrierte Lösungen zugegeben. Um ein Festmedium zu erzeugen, wurde das SC-Medium mit

4 Material und Methoden

zweifacher Konzentration angesetzt und mit 4 % (w/v) Wasseragar 1:1 gemischt.

Kultivierung von *Ustilago maydis*

Flüssigkulturen von *Ustilago maydis* wurden in der Regel in YEPS Medium angezogen. In den Fällen, wo die Anwesenheit, bzw. die Abwesenheit einer Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle im Medium erforderlich war, wurde YNB-Medium verwendet, dem der gewünschte Stoff zugesetzt wurde. Die Kulturen wurden unter aeroben Bedingungen bei 30°C inkubiert. Für die Anzucht auf Festmedium wurde meist PD-Agar verwendet, dem bei Bedarf die Fungizide Hygromycin (200 µg/ml), Nourseotricin (150 µg/ml), Phleomycin (40 µg/ml) und Carboxin (2 µg/ml) zugesetzt wurden. In besonderen Fällen wurde, aus oben beschriebenen Gründen, YNB-Agar verwendet. Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden Übernachtskulturen des Pilzes 1:1 mit NSY-Glycerin-Medium gemischt und bei -80°C eingefroren.

YEPS-	10 g/l Hefeextrakt	YNB-	1,7 g/l Yeast Nitrogen Base
Medium:	20 g/l Pepton	Medium:	0,2 % (w/v) Ammoniumsulfat oder KNO ₃ ⁻
	2,0 % (w/v) Saccharose		2,0 % (w/v) Glukose oder Arabinose
NSY-	0,8 % (w/v) Nutrient Broth	PD-Agar:	24 g/l Potato Dextrose Broth
Glycerin-	0,1 % (w/v) Hefeextrakt		2,0 % Agar
Medium:	0,5 % (w/v) Sucrose		
	80 % (v/v) 87 % Glycerin		

4.4.2 Isolierung von Nukleinsäuren

Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte nach einer modifizierten Variante der „Alkalischen Lyse“ (Birnboim and Doly, 1979). 1,5 ml der plasmidtragenden *E. coli* Übernachtskultur wurden zentrifugiert (1 min, 13000 rpm) und das Zellsediment in 100 µl Lösung A resuspendiert. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, wurden 200 µl Lösung B zugegeben. Es wurde so lange auf Eis inkubiert, bis sich ein klares Lysat bildete. Dieses wurde durch die Zugabe von 200 µl Lösung C neutralisiert und anschließend zentrifugiert (10 min, 13000 rpm). Aus dem klaren Überstand wurde die Plasmid-DNA in einem neuen Reaktionsgefäß durch Zugabe von 400 µl Isopropanol gefällt und in einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 13000 rpm) pelletiert. Der Niederschlag wurde mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend nach vollständiger Entfernung des Ethanols in 20-50 µl TE mit RNaseA aufgenommen. Die Langzeitlagerung der präparierten Plasmide erfolgte bei -20°C.

Lösung A:	50 mM Glukose	Lösung B:	200 mM NaOH
	25 mM Tris/HCl pH8,0		1 % (w/v) SDS
	10 mM Na ₂ -EDTA		
	100 µg/ml RNaseA	TE-RNaseA:	10 mM Tris/HCl pH 8,0
			1 mM Na ₂ -EDTA
Lösung C:	3 M Kaliumacetat pH4,8		50 µg/ml RNaseA

Um besonders reine Plasmid-DNA zu erhalten, wurde der High-Speed Plasmid Mini Kit der Firma Avogene gemäß dem Herstellerprotokoll verwendet.

Präparation von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* wurden 3 ml Flüssigkultur abzentrifugiert, das Sediment in 200 μ l Lösung A (siehe: alkalische Lyse) resuspendiert und mit Glasperlen vermischt. Der Zellaufschluss erfolgte auf dem Vibrax bei maximaler Geschwindigkeit. Zur Gewinnung der Plasmide aus der Suspension wurde das High-Speed Plasmid Mini Kit der Firma Avegene nach Herstellerangaben verwendet.

Präparation von chromosomaler DNA aus *Ustilago maydis*

Zur Gewinnung von chromosomaler DNA aus *U. maydis* wurden 3 ml einer dicht gewachsenen Übernachtskultur abgenommen und in einem entsprechenden Reaktionsgefäß zentrifugiert (1 min, 13000 rpm). Das Sediment wurde in 500 μ l Lysis-Puffer resuspendiert und mit 0,3 g Glasperlen und 500 μ l Phenol/Chloroform versetzt. Der Ansatz wurde nach 10 minütigem Schütteln auf dem Vibrax zentrifugiert (10 min, 13000 rpm). Die obere, klare Phase wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 50 μ l 3 M Natriumacetat, pH 5,3 und 800 μ l 96 %igem Ethanol gemischt und zentrifugiert (10 min, 13000 rpm). Der Niederschlag wurde mit 500 μ l 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend nach vollständiger Entfernung des Ethanols in 20-50 μ l TE mit RNaseA aufgenommen. Die Langzeitlagerung der präparierten DNA erfolgte bei -20°C.

Lysis-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH8,0	Phenol/	50 % (v/v) Phenol
	100 mM NaCl	Chloroform:	50 % (v/v) Chloroform
	1 mM EDTA		
	1 % (w/v) SDS		
	2 % (w/v) Triton X-100		

Präparation von RNA aus *Ustilago maydis*

Zur Präparation von RNA aus *U. maydis* wurden 20 ml einer exponentiell wachsenden Kultur zentrifugiert (10 min, 3500 rpm) und das Sediment bei -80°C schockgefroren. Anschließend wurde das Sediment in 1 ml TRIzol Reagenz (Invitrogen) aufgenommen und in ein vorbereitetes 2 ml Eppendorf-Röhrchen mit Glasperlen überführt. Die Zellen wurden in der Zelmühle 10 min mit maximaler Geschwindigkeit aufgeschlossen. Dann wurde die Probe mit 200 μ l Chloroform gemischt und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren (11000 rpm, 15 min, 4°C) wurde die obere, wässrige Phase in einem frischen Eppendorf-Röhrchen mit 500 μ l Isopropanol gemischt. Nach 10 minütiger Präzipitation bei Raumtemperatur wurde die RNA sedimentiert (11000 rpm, 15 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde mit 1 ml 80 % ETOH gewaschen (11000 rpm, 5 min, 4°C). Nach vollständigem Entfernen des Waschalkohols wurde die RNA in 50 μ l RNasefreiem Wasser aufgenommen, bei 50°C für 10 min gelöst und bei -80°C eingefroren.

4.4.3 Analyse und Modifikation von Nukleinsäuren

Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA

Zur Aufspaltung der DNA durch Restriktionsendonukleasen wurden Enzyme und die dazugehörigen Puffersysteme der Firmen New England Biolabs und Fermentas verwendet. Sowohl die Pufferkonzentration, als auch die Inkubationstemperatur und Enzymkonzentration wurde nach Herstellerangaben

gewählt. Bei Ansätzen mit zwei Enzymen wurde auf die Puffer-Kombinationstabellen der Hersteller zurückgegriffen.

Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurden Agarosegele benutzt (Sharp et al., 1973). Eine Suspension von 0,8-1,5 % Agarose in TAE-Puffer wurde aufgeköcht, nach dem Herunterkühlen auf 60°C bis auf eine Endkonzentration von 1-5 µg/ml mit Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelschlitten mit eingestecktem Kamm eingegossen. Nach dem Erstarren des Geles wurde der Kamm entfernt und der Schlitten in die mit TAE-Puffer befüllte, horizontale Gelkammer eingelegt. Die aufzutrennenden DNA-Lösungen wurde mit 1/10 Volumen 10x Auftragspuffer gemischt und in die Taschen gegeben. Die Auftrennung erfolgte bei 80-130 V. Als Größenstandard wurde der GenerulerTM DNA Ladder Mix der Firma Fermentas verwendet. Zur Dokumentation wurden die DNA-Banden durch UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert.

TAE-	40 mM Tris/HCl pH8,3	DNA-	0,2 % (w/v) Orange G
Laufpuffer:	20 mM Natriumacetat	Auftragspuffer:	50 % (w/v) Saccharose
	2 mM EDTA		1 mM EDTA

Auftrennung von RNA mittels denaturierender Glyoxal/DMSO-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von RNA durch Agarosegelelektrophorese, wurden 5-20 µl der RNA-Lösung mit 5 µl 10x MOPS-Puffer, 5 µl 8M Glyoxal und 10 µl DMSO gemischt und für eine Stunde bei 50°C denaturiert. Nach dem Zusetzen von 4 µl Auftragspuffer wurden die Proben in einem 1 %igen MOPS-Agarosegel bei 90 V aufgetrennt. Hierbei wurde das Gel jede halbe Stunde in der Kammer gedreht, wobei auch die Kammer umgepolt wurde, um den pH-Wert des Puffers möglichst konstant zu halten.

10x MOPS-	200 mM MOPS pH7,0	RNA-	50 % (w/v) Saccharose
Puffer:	80 mM Natriumacetat	Auftragspuffer:	0,25 % (w/v) Bromphenolblau
	10 mM Na ₂ -EDTA		0,25 % (w/v) Xylencyanol FF
			in MOPS-Puffer

Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolation spezifischer DNA-Fragmente aus den Gelen, wurden entsprechende Banden ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit der Firma AVEGENE den Herstellerangaben folgend extrahiert.

Dephosphorylierung von DNA

Um die Selbstligation von Vektoren zu minimieren, wurden die geschnittenen Vektoren mit der Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) der Firma Fermentas, in entsprechendem, vom Hersteller mitgelieferten Puffer, dephosphoryliert. Das Enzym wurde den Ansätzen im Volumen von 0,5-1 µl zugegeben und nach der einstündigen Inkubation bei 37°C durch Hitze inaktiviert (15 min, 65°C).

Ligation von DNA-Fragmenten

Zur kovalenten Verknüpfung von zwei bis drei DNA-Fragmenten, wurden diese in geeignetem Verhältnis (i.d.R. 1/10 Vektor und 9/10 zu inserierendes Fragment) in einem Reaktionsgefäß auf ein Endvolumen von 17,5 µl vereinigt und mit 2 µl 10xLigasepuffer und 0,5 µl T4-DNA-Ligase der Firma Roche Diagnostics GmbH versetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 14°C.

DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977) und wurde von der Firma eurofins durchgeführt.

Transfer und Detektion von DNA auf Membranen (Southern Blot)

Zur Detektion von DNA-Restriktionsfragmenten definierter Größe und Sequenz wurde die Southern Blotting Methode (Southern, 1992) durchgeführt. Dabei wurden elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran übertragen und durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden nachgewiesen. Chromosomale DNA wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut, im Agarosegel aufgetrennt und zur Dokumentation unter UV-Licht photographiert. Das Gel wurde erst für 15 min zur Depurinierung in 0,25 M HCl und danach für 20 min in 0,4 N NaOH inkubiert. Zur Übertragung der DNA auf die Nylonmembran (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia) wurde eine Glasplatte über ein Bassin mit 0,4 N NaOH gelegt. Quer über die Glasplatte wurde ein Streifen in Transferpuffer getränktes Blotting-Papier so aufgelegt, dass beide Enden ins Vorratsbassin eintauchten. Dann wurde das Gel mit den Taschenöffnungen nach unten aufgelegt, gefolgt von der, mit Transferpuffer benetzten, Nylonmembran und drei Schichten in Puffer getränkten Blotting-Papiers. Um die aufwärtsgerichteten Kapillarkräfte zu unterstützen, wurde eine dicke Schicht saugfähiges Papier aufgelegt und die Konstruktion mit einem Gewicht von 300-500 g beschwert. Geblottet wurde über Nacht. Die Membran wurde nach dem Blotten getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung (254 nm, 1200 mJ/cm²) im Stratalinker 2400 (Stratagene) darauf fixiert. Die auf der Nylonmembran fixierte DNA wurde mit einer radioaktiven Sonde hybridisiert (Church and Gilbert, 1984). Die Membran wurde 20 min bei 60°C in 15 ml Southern-Hybridisierungspuffer vorinkubiert. Die Sonde wurde 5 min bei 95°C denaturiert und hinzugegeben (Endkonzentration etwa 10⁶ cpm/ml). Es wurde über Nacht bei 60°C inkubiert und die Membran anschließend in 2x 15 ml Southern-Waschpuffer 20 min gewaschen. Anschließend wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und ein bis zwei Tage in einer Phosphorimager Kassette (Amersham) exponiert. Die Detektion der Signale erfolgte mit Hilfe eines Phosphorimagers (Storm860, Amersham).

Depurinierungs- Lösung:	0,25 M HCl	Transfer- Lösung:	0,4 M NaOH
Hybridisierungs- puffer:	7 % (w/v) SDS 500 mM Natriumphos- phat Puffer pH7,0	Waschpuffer:	1 % (w/v) SDS 100 mM Natriumphos- phat Puffer pH7,0

Transfer und Detektion von RNA auf Membranen (Northern Blot)

Für die Detektion spezifischer RNA wurde diese mittels einer denaturierenden Glyoxal/ DMSO-Gelelektrophorese in einem 1 %igen MOPS-Agarosegel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid aufgetrennt.

4 Material und Methoden

Die Gleichmäßigkeit der unter UV-Licht sichtbaren 18s- und 28s-rRNA Banden wurde dokumentiert. Das Gel wurde 15 min in 20x SSC inkubiert. Der Transfer der RNA auf die Nylonmembran (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia) erfolgte im Kapillarblot, wie für den Southern Blot beschrieben, aber mit 20x SSC als Transferpuffer. Auch die Fixierungs-, Hybridisierungs- und Detektionsverfahren waren gleich. Es wurde jedoch der Northern-Hybridisierungs- und der Northern-Waschpuffer an Stelle der Southern-Puffer verwendet.

20x SSC:	300 mM Natriumcitrat-Puffer pH7,0 3 M NaCl	Northern-Hybridisierungs-puffer:	50 mM PIPES pH6,5 100 mM NaCl 50 mM Natriumphosphat-puffer pH7,0
Northern-Waschpuffer:	1 x SSC 5 % (w/v) SDS		1 mM EDTA 5 % (w/v) SDS

Herstellung von radioaktiv markierten Sonden

Zur Herstellung der radioaktiven Sonden wurde das Megaprime Labeling System der Firma Amersham Biosciences verwendet. Dabei wurden 25 ng Sonden-DNA mit einer Länge von 400-1000bp mit 5 µl der Primer-Lösung (Hexanukleotide mit zufälliger Sequenz) und destilliertem Wasser auf ein Volumen von 33 µl aufgefüllt und im Heizblock bei 95°C 5 min denaturiert. Danach wurde der Ansatz kurz auf Eis gekühlt und 10 µl Reaktionspuffer (Puffersubstanzen und alle dNTPs ausser dCTP), 2 µl Klenow Polymerase und 5 µl α³²P-dCTP zugegeben. Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 5 µl 0,2 M EDTA gestoppt. Die Sonde wurde zuletzt mit Hilfe einer Mobitec S-200 Säule durch Zentrifugation von überschüssigen Nukleotiden gereinigt.

Amplifikation von DNA

Die DNA wurde mittel „Polymerase-Chain-Reaction“ amplifiziert (Mullis et al., 1986; Bell, 1989; White et al., 1989). Durch die thermostabilen Polymerasen Pfx (Invitrogen) und Phusion (Finnzymes) wurden mit Hilfe von Oligos und dNTPs spezifische DNA-Fragmente amplifiziert. Die PCR-Reaktion läuft in 3 charakteristischen Schritten ab. Zunächst wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 94°C denaturiert und so in einzelsträngige DNA überführt. Bei einer Temperatur zwischen 50-60°C binden die PCR-Primer an die DNA-Einzelstränge (Annealing). Die thermostabile Polymerase synthetisiert anschließend ausgehend von den Primern einen komplementären DNA-Strang. Durch eine erneute Denaturierung bei 94°C beginnt der Zyklus erneut. Sowohl die verwendeten Puffer-, Oligo-, dNTP- und DNA-Konzentrationen, als auch die Inkubationszeiten und Temperaturen richteten sich nach den Herstellerangaben.

Standard-PCRs wurden in einem Endvolumen von 50µl wie folgt durchgeführt:

5 µl	10x PCR-Puffer
1 µl	MgSO ₄ (50 mM)
1 µl	dNTPs (10 mM)
0,5 µl	5'Primer (25 mM)
0,5 µl	3'Primer (25 mM)
100 ng	Matrizen-DNA
2,5 U	DNA-Polymerase
H ₂ O	ad 50 µl

Standard PCR-Programm:	5 min 95°C (initiale Denaturierung)	} 30x
	1 min 95°C (Denaturierung)	
	1 min 40-65°C (Annealing, abhängig von Primern)	
	1 min 72°C (Elongation, 1 min pro kb)	
	10 min 72°C (Auffüll-Reaktion)	

Die PCR-Produkte konnten anschließend in den Klonierungsvektor pJET2.1 ligiert werden.

4.4.4 Transformation von Mikroorganismen

Herstellung von chemokompetenten *E. coli* Zellen

Chemokompetente *E. coli*-Zellen wurden nach der CCMB 80 Methode hergestellt. 100 ml DYT-Flüssigkultur wurden aerob bei 37°C bis auf eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0.4 angezogen. Die Kultur wurde 20 min auf Eis inkubiert und die Zellen anschließend zentrifugiert (3500 rpm, 5 min, 4°C). Das Sediment wurde in 30 ml CCMB 80 Puffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut zentrifugiert (3500 rpm, 15 min, 4°C) und das Sediment in 8 ml CCMB 80 Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden in 50 µl Aliquots bei -80°C tiefgefroren.

CCMB 80:	CaCl ₂ 11,8 g/l
	MnCl ₂ 4 g/l
	MgCl ₂ 2 g/l
	Kaliumacetat 10 ml/l einer 1M Stocklösung
	Glycerin 100 ml/l

Transformation von chemokompetenten *E. coli*-Zellen

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 10 µl des Ligationsansatzes mit 50 µl chemokompetenten Zellen gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz für eine Minute auf 42°C erwärmt, danach mit 1 ml dYT-Medium versetzt und für 30-60 min unter aeroben Bedingungen bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, das Sediment in 100 µl steriles Wasser aufgenommen und auf Selektivmedium ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Protoplastierung von *U. maydis*

Zur Herstellung von *U. maydis*-Protoplasten wurden 50 ml YEPS-Flüssigkulturen der jeweiligen Stämme bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von ca. 0,5 angezogen und anschließend zentrifugiert (3500 rpm, 5 min, RT). Das Zellsediment wurde in 25 ml SCS-Lösung resuspendiert und erneut abzentrifugiert (3500 rpm, 5 min, RT). Dann wurde das Sediment in 2 ml SCS-Lysing-Enzymes-Lösung (SIGMA) aufgenommen und die Protoplastierung der Zellen unter dem Mikroskop verfolgt. Als der Anteil an Protoplasten im Ansatz ca. 70% betrug, wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml eiskalter SCS-Lösung gestoppt und die Protoplasten pelletiert (2500 rpm, 10 min, 4°C). Das Sediment wurde zweimal mit 10 ml eiskalter SCS-Lösung und einmal mit dem gleichen Volumen an eiskalter

4 Material und Methoden

STC-Lösung gewaschen und in 300 μ l eiskalte STC-Lösung aufgenommen. Die Protoplasten wurden in Volumina von 50 μ l aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

SCS-Puffer:	20 mM Natriumcitrat -Puffer pH5,8 1 M Sorbitol	STC-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH7,5 100 mM CaCl ₂ 1 M Sorbitol
SCS-Lysing-Enzymes- Lösung:	35 mg/ml Lysing Enzymes in SCS		

Transformation von *U. maydis*-Protoplasten

Zur Transformation wurden 50 μ l *U. maydis*-Protoplasten auf Eis aufgetaut und mit 500 ng der zu transformierenden DNA versetzt. Der Ansatz wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 350 μ l STC/PEG zugegeben und erneut für 15 min auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe von PEG wurden die Zellmembranen für die zugegebene DNA permeabel gemacht. Der Ansatz wurde auf Regenerationsagar ausplattiert. Dieser wurde in zwei Schichten übereinander gegossen, von denen die untere das Fungizid in zweifacher Konzentration enthielt, für das die transformierte DNA die Resistenz vermittelte. Die obere Schicht war frei von Selektionsfaktoren. So stellte sich durch Diffusion zwischen den beiden Schichten erst über einen längeren Zeitraum hinweg die übliche Konzentration des Antibiotikums ein, so dass es vorher zur Ausprägung der Resistenz in den transformierten Zellen und zu deren Regeneration kommen konnte. Die Platten wurden bei 28°C inkubiert.

STC/PEG: 40 % (w/v) Polyethylenglycol in STC

Transformation von *S. cerevisiae* Zellen

Der zu transformierende Hefestamm wurde in 50 ml YEP Medium mit 1 % (w/v) Glukose über Nacht bis auf eine OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Die Kultur wurde abzentrifugiert (3000 rpm, 10 min, RT), der Überstand verworfen und das Sediment in einem der Anzahl an Transformationen angepasstem Volumen LiT aufgenommen. Aliquots von 100 μ l wurden in sterile Eppendorf-Röhrchen verteilt und mit 5 μ l denaturierter Herinssperma-DNA (10 mg/ml) und 1 μ g Plasmid-DNA gemischt. Nach Zugabe von 500 μ l LiT-PEG wurde der Ansatz unter stetigem Durchmischen bei RT für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden 50 μ l DMSO zugegeben und für 15 min bei 42°C inkubiert. Nach kurzem Abzentrifugieren (3000 rpm, 30 s) wurde die Zellen in 100 μ l sterilem Wasser aufgenommen und auf Selektionsmedium ausplattiert.

LiT:	10 mM Tris-HCl pH 7,4 100 mM Lithiumacetat	LiT-PEG:	100g PEG in 100 ml LiT
------	---	----------	---------------------------

4.4.5 Proteinbiochemische Methoden

Proteinextraktion aus *U. maydis* Zellen

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus *U. maydis* wurden 25 ml einer dichten Flüssigkultur zentrifugiert (3500 rpm, 5 min, RT) und das Sediment in 10 ml TBS-Puffer gewaschen. Nach einem weiteren

4 Material und Methoden

Zentrifugationsschritt (3500 rpm, 5 min, RT) wurde das Sediment in 500 μ l TBS aufgenommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Zellsuspension wurden 0,3 g Glasperlen, 5 μ l 10 % Triton X-100 und 5 μ l Protease Inhibitor Cocktail für Pilze (Sigma) zugesetzt und der Ansatz in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dann wurde das Reaktionsgefäß bei 4°C 30 min auf dem Vibrax geschüttelt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4°C). Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt. Die Langzeitlagerung der Proteine erfolgte bei -80°C.

TBS: 50 mM Tris/HCl pH7,5
 150 mM NaCl

Konzentrationsbestimmung von *U. maydis* Proteinextrakten

Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976), allerdings in einer modifizierten Form mit Biorad-Reagenz (Biorad). Die Proteinproben wurden auf ein Endvolumen von 100 μ l um den Faktor 1:10 in TBS verdünnt. 10 μ l davon wurden mit 990 μ l der um den Faktor 1:5 verdünnten Biorad-Lösung gemischt. Der Nachweis erfolgte sofort im Photometer bei einer Wellenlänge von 595nm. Zur Standardisierung wurden BSA-Verdünnungsreihen mit definierten Konzentrationen eingesetzt.

SDS-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der Proteinextrakte wurden SDS-haltige Polyacrylamidgele genutzt. 6 %ige Polyacrylamidgele dienten dem Nachweis der Cdc24-GFP Fusion, 12 %ige dem von GFP.

Komponente	%	1 M Tris pH8,8	1 M Tris pH6,8	SDS	Aa/Bis 30:0,8	H ₂ O	APS	TEMED
Trenngel	6	2250 μ l	-	75 μ l	1200 μ l	2400 μ l	100 μ l	10 μ l
Trenngel	10	2250 μ l	-	75 μ l	2000 μ l	1600 μ l	100 μ l	10 μ l
Trenngel	12	2250 μ l	-	75 μ l	2400 μ l	1200 μ l	100 μ l	10 μ l
Sammelgel	-	-	375 μ l	30 μ l	500 μ l	2050 μ l	50 μ l	7,5 μ l

APS-Stammlösung: 10 % (w/v) Ammoniumperoxidsulfat
SDS-Stammlösung: 10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat

Für die Proteingele wurden Mini-PROTEAN Tetra Cell Apparaturen (Biorad) verwendet. Die Apparatur wurde nach Herstellerangaben zusammengesetzt, auf ihre Dichtheit überprüft und zuerst das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen. Dieses wurde mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels, wurde der Alkohol vollständig abgenommen, das Sammelgel eingegossen und der Kamm eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels, wurde der Kamm entfernt, die Taschen sorgfältig gespült und das Gel in die vertikale Laufkammer eingesetzt. Die äußere und die innere Pufferkammer wurden mit Laufpuffer befüllt. Die Proteinproben wurden in TBS auf eine Konzentration von 2 μ g/ μ l verdünnt und je 10 μ l dieser Proteinlösung mit 3 μ l 3x Probenpuffer versetzt. Die Ansätze wurden 5 min zur Denaturierung aufgekocht, kurz auf Eis heruntergekühlt und

4 Material und Methoden

auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V. Als Längenstandard wurde der Marker „Page Ruler Prestained Protein Ladder“ der Firma Fermentas verwendet.

3x Protein-	400 mM Tris/HCl pH6,8	Proteingel	0,25 % (w/v) Coomassie
Auftragspuffer:	30 mM DTT	-Färbelösung:	Brilliant Blue R-250
	6 % (w/v) SDS		20 % (v/v) Methanol
	40 % (v/v) Glycerin		10 % (v/v) Essigsäure
	0,006 % (w/v) Bromphenolblau		
Laufpuffer:	25 mM Tris/HCl pH8,8	Entfärber:	20 % (v/v) Methanol
	200 mM Glycin		10 % (v/v) Essigsäure
	0,2 % (w/v) SDS		

Transfer und Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)

Die Proteine wurden auf einer PVDF-Membran durch Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Gültekin and Heermann, 1988). Für den Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran (Roth) wurde ein „Wet-Blot“ mit einer Mini Trans-Blot Cell (BioRad) durchgeführt. Dabei wurde ein mit Blottpuffer getränktes Schwämmchen auf die der Kathode zugewandte Seite der Blot-Kassette gelegt und mit einem ebenfalls in Puffer getränktem Whatman-Papier überschichtet. Darauf wurde das Trenngel platziert. Auf das Trenngel wurde die in Methanol aktivierte PVDF Membran aufgelegt und mit einer weiteren Lage Papier und dem zweiten Schwämmchen überschichtet. Die Kassette wurde in die Blot-Apparatur eingespannt und bei 25 V über Nacht, oder bei 100 V für eine Stunde geblottet. Die Membran wurde in TBST_{0,1}-Milch 10 min unter Rotation abgesättigt und in einen Plastikbeutel eingeschweißt. In diesen wurden 10 ml einer 1:1000 Verdünnung des primären Antikörpers (GFP mouse monoclonal IgG_{2a}, Santa Cruz Biotechnology; HA mouse monoclonal IgG, eigene Herstellung; RFP mouse monoclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology; Tub1 mouse monoclonal IgG, Calbiochem; Myc rabbit monoclonal IgG, Sigma) in TBST_{0,1}-Milch eingefüllt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C auf der Wippe inkubiert. Dann wurde die Membran 3x 10 min in 10 ml TBST_{0,1} gewaschen und danach mit einer 1:1000 Verdünnung des sekundären Antikörpers (donkey anti-mouse IgG-HRP conjugate, Santa Cruz Biotechnology; goat anti rabbit IgG-HRP conjugate, Santa Cruz Biotechnology) in TBST_{0,1}-Milch zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Nachweis der Proteine durch Chemilumineszenz wurde die Membran 3x 10 min in 10 ml TBST_{0,1} gewaschen, abgetropft und in eine nach drei Seiten hin offene Plastikhülle gelegt. 0,5 ml der Detektionslösung 1 wurden mit 0,5 ml der Detektionslösung 2 gemischt und auf die Membran aufgetropft. Überschüssige Lösung wurde zu den Seiten hin aus der Plastikhülle gestrichen. Die Membran wurde in ihrer Hülle in eine Röntgenkassette eingelegt, ein Film aufgelegt und der Blot für 15 s-5 min in der geschlossenen Kassette exponiert. Dann wurde der Film entwickelt. Die Membran wurde 1 min in einer Schale Ponceau-S-Lösung (Sigma) gebadet und dann so lange in Wasser entfärbt, bis die Gesamtheit der Proteinbanden auf ihr deutlich sichtbar waren.

Transferpuffer:	25 mM Tris	TBST:	0,1 % (v/v) Tween 20 in TBS
	200mM Glycin		
	0,02 % (w/v) SDS	TBST-Milch:	TBST mit 3% (w/v)
	20 % (v/v) Methanol		Trockenmilch

4 Material und Methoden

Luminol A:	100 mM Tris/HCl pH 8,5	Luminol B:	100 mM Tris/HCl pH 8,5
	2,5 mM Luminol		5,4 mM H ₂ O ₂
	400 μ M P-Cumarsäure		

Aufreinigung von Fusionsproteinen aus *E. coli*

Die DH-PH Tandem Domäne von Cdc24 und die Vollängen GTPasen wurden als GST-Fusionsproteine im pGEX Vektor System (GE-Healthcare) oder als NusA-6xHis-Fusionsproteine in Vektor pETM6 (Dümmmler et al., 2005) in dem *E. coli* Stamm BL21-CodonPlus(DE3)-RP(Codon3+) überexprimiert. Die Zellen wurden über Tag in 1 l DYT Medium bei 37°C bis auf eine OD₆₀₀ von 0,4-1 angezogen. Die Induktion erfolgte über Nacht bei 24°C und 0,25 mM IPTG. Anschließend wurde die Zellen abzentrifugiert und in 10-15 ml Lyse-Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte in der „French-Press“. Der durch Ultrazentrifugation (35000 rpm, 1 h, 4°C) geklärte Extrakt wurde anschließend mit GSH-Agarose (Macherey-Nagel) oder Ni-NTA-Agarose (Qiagen) gemischt und bei 4°C eine Stunde unter Rotation inkubiert. Die beladene Agarose wurde abzentrifugiert (500 rpm, 15 min, 4°C) und dreifach mit Lyse-Puffer gewaschen. Die GST-Fusionsproteine wurden mit 10 mM reduziertem Glutathion bei pH 8,8 eluiert und die NusA-6xHis-Fusionsproteine mit 50 mM Imidazol. Die Proteine wurden bei -80°C gelagert.

Lyse-Puffer:	50 mM Tris-HCl pH 7.5
	100 mM NaCl
	10 mM MgCl ₂
	5 mM DTT oder 2.5 mM 2-mercaptoethanol
	Protease Inhibitor (Roche)

Kopräzipitationen

Die aufgereinigten GTPasen wurden an GSH-Agarose (Macherey-Nagel) oder Ni-NTA-Agarose (Qiagen) gebunden. Zur Beladung mit GDP oder GTP γ S wurden die GTPasen in Lyse-Puffer, mit 20 mM EDTA und entweder 10 mM GDP oder 1 mM GTP γ S inkubiert (1 h, 4°C). Anschließend wurde die Beladung durch die Zugabe von MgCl₂ bis zu einer finalen Konzentration von 20 mM gestoppt. Die beladenen GTPasen wurden zweifach mit Lysepuffer gewaschen. Jeweils 10 μ l GTPase wurden mit 100-200 μ g *U. maydis* Proteinextrakt gemischt, der eine markierte Variante des interagierenden Proteins enthielt. Um den Beladungsstatus der GTPasen zu erhalten, wurden den Ansätzen 10 mM GDP oder 1 mM GTP γ S zugesetzt. Die Ansätze wurden eine Stunde bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Agarose sedimentiert (3000 rpm, 1 min, 4°C) und fünffach mit 1 ml Lyse-Puffer gewaschen. Das Präzipitat wurde in SDS-Probenpuffer aufgekocht, in einem SDS-Gel aufgetrennt und die präzipitierten Proteine nach dem Transfer auf PVDF Membranen mit spezifischen Antikörpern detektiert.

GST-CRIB-Präzipitation

Für die CRIB-Präzipitation wurde GSH-Agarose mit aufgereinigtem GST-CRIB Protein beladen. Die *U. maydis* Extrakte wurden vier Stunden nach Induktion der Überexpression des bE1/bW2 Transkriptionsfaktors oder der Cdc24 Varianten präpariert. Die geklärten Extrakte mit definierter Proteinkonzentration wurden mit gleichen Mengen GST-CRIB-beladener GSH-Agarose inkubiert (30 min, 4°C). Das Präzipitat wurde dreifach gewaschen, und die Proteine im „Western-Blot“ nachgewiesen.

Quantifizierung von Proteinmengen

Zur Quantifizierung der Stärke der HRP-Fluoreszenz bei der Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen, wurden die Signale mit Hilfe einer Chemokamera der Firma INTAS und der zugehörigen Software ChemoStar photographiert. Die Quantifizierung der Signalintensität erfolgte mit dem Programm ImageJ (Abramoff et al., 2004). Dazu wurden die einzelnen Banden mit dem Werkzeug „Rectangular Selections“ markiert und der durchschnittliche Grauwert „Mean Gray Value“ mit dem Werkzeug „Measure“ im Menü „Analyze“ bestimmt. Von diesem Wert wurde der gemessene Wert für den Hintergrund des Photos abgezogen. Um die erhaltenen Werte für die einzelnen Banden auf die eingesetzte Gesamtproteinmenge zu normieren, wurde der zu quantifizierende Wert durch den, in der gleichen Spur, für die Kontrolle Tub1 erhaltenen Wert dividiert. Anschließend wurde die prozentuale Abweichung der Messwerte von der Wildtyp Kontrolle berechnet.

4.4.6 Infektion von *Zea mays*

Zum Test der Pathogenität von *U. maydis*-Stämmen wurden im Gewächshaus gezogene 7 Tage alte Maispflanzen der Sorte Early Golden Bantam infiziert. Dazu wurden Kulturen des solopathogenen Stammes SG200 mit einer OD₆₀₀ von 0,5 abzentrifugiert und eine Zellsuspensionen mit OD₆₀₀ 1,0 in sterilem Wasser hergestellt. Je 500 µl wurden mit Hilfe einer Spritze in den Stängel der Pflanze unterhalb des Blattansatzes injiziert. Die Pflanze konnte nach 14 Tagen auf Chlorose-, Anthocyan- und Gallenbildung untersucht werden.

4.4.7 Mikroskopie von *U. maydis*-Zellen

Zur Mikroskopie von *U. maydis*-Zellen kam ein Fluoreszenzmikroskop vom Typ Axiovert 200M mit einem Ludel Piezo Drive (Zeiss) zum Einsatz. Die Färbungen erfolgten mit den Fluoreszenzfarbstoffen, die in der nachfolgenden Tabelle angegeben sind. Sie wurden (bis auf GFP) den Flüssigkulturen in der genannten Endkonzentration beigemischt (Inkubationszeit: 5 min). Die zu untersuchenden Zellen wurden im Volumen von 1 µl auf einen mit einer ca. 0,5 mm dicken Wasseragarschicht bedeckten Objektträger aufgetropft. Anschließend wurde das Deckglas aufgelegt. Der Wasseragar diente der Fixierung der Zellen an ihrer Position um unscharfe Bilder zu vermeiden. Zur Anregung der verschiedenen Farbstoffe wurden die zur Wellenlänge passenden Filter genutzt. Vergleichsphotos wurden im Differentialkontrast gemacht. Der Dokumentation diente eine Kamera des Typs ORCA (Hamamatsu) und die Software Volocity 5.0. Die Bilder wurden mit ImageJ (Abramoff et al., 2004) bearbeitet.

Name	Zellbestandteil	µg/ml Kultur	Excitation	Emission	Farbe
GFP	Fusionsproteine	-	400 nm	509 nm	grün
Calcofluor	Glucan	2	350 nm	461 nm	blau
CMAC	Vakuolen	1	350 nm	466 nm	blau

4.5 Genutzte Kits, Chemikalien und Enzyme

4.5.1 Allgemeine Materialien

Material	Bezugsquelle
Blottingpapier	Roth (Karlsruhe)
Cryo-Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Glasperlen	Sigma (Deisenhofen)
Kunststoff-Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht)
Mais-Samen	Old Seed Solutions (Madison, US)
MobiSpin Columns	MoBiTec (Göttingen)
Nylon-Membran	Roth
Petrischalen	Greiner, Sarstedt
Pipettenspitzen	Greiner, Sarstedt
PVDF-Membran	Roth
Röntgenfilm	CEA AB (Strängnäs, Schweden)
Schikanekolben	Ochs (Bovenden)
Sterile Spritzen und Kanülen	Braun (Melsungen)
Sterilfilter	Sarstedt

4.5.2 Kits

Name des Kits	Bezugsquelle
High-Speed Plasmid Mini Kit	Avegene
Megaprime Labeling Kit	Amersham (Braunschweig)
Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit	Avegene

4.5.3 Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
Acrylamidmix (40:2)	Roth (Karlsruhe)
Adenin	Sigma (Deisenhofen)
Agar-Agar	Roth
Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Alanin	Serva (Heidelberg)
Ampicillin	Roth
APS	Roth
Arabinose	Roth
Arginin	Sigma
Asparagin	Sigma
Asparaginsäure	Sigma
Bacto-Agar	Difco (Detroit, US)
Bromphenolblau	Sigma

4 Material und Methoden

Chemikalien	Bezugsquelle
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Calcofluor	Sigma
Chloroform	Roth
CMAC	Molecular Probes (Oregon,US)
p-Cumarsäure	Roth
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	Hartmann Analytic
Cycloheximid	Roth
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Fermentas
Dimethylsulfoxid	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
1,4-Dithiothreitol	Roth
EDTA	Roth
Eisen(III)-Chlorid	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol (unvergällt)	Roth
Ethidiumbromid	Roth
FM4-64	Molecular Probes
Glukose	Roth
Glutathion-Agarose	Macherey-Nagel (Düren)
Glutathion reduziert	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
GDP	Sigma
GTP γ S	Jena Bioscience
Hefeextrakt	GibcoBRL Life Technologies (Eggenstein)
Heringssperma-DNA	Sigma
Histidin	Merck
Hygromycin	Duchefa Biochemie (Haarlem, NL)
Isoleucin	Merck
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumnitrat	Roth
Kupfersulfat	Roth
L-Histidin	Roth
Lithiumacetat	Sigma
L-Leucin	Merck
Luminol	Fluka BioChemika
Lysin	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Manganchlorid	Mallinckrodt Baker BV (Deventer, NL)
Methanol	Roth
Methionin	Merck
MOPS	Biomol (Hamburg)
clonNAT	Werner BioAgents (Jena)

4 Material und Methoden

Chemikalien	Bezugsquelle
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumcitrat	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natriummolybdat	Merck
6%CL-Nickel ChroMatrix	Jena Bioscience
Nutrient Broth	Difco
Orange G	Sigma
p-Amino-Benzoesäure	Sigma
Paraffinöl	Merck
Pepton	Difco
Phenol	Roth
Phenylalanin	Merck
Phleomycin	Invitrogen
PIPES	Sigma
Polyethylenglycol (PEG 3350)	Merck
Potato Dextrose Broth	Difco
Prolin	Serva
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma
Salzsäure	Roth
Serin	Roth
Sorbitol	Sigma
TEMED	Roth
Threonin	Sigma
Tris	Roth
Triton X-100	Sigma
TriZol	Invitrogen
Trypton	GibcoBRL Life Technologies
Tryptophan	Merck
Tween 20	Roth
Tyrosin	Sigma
Uracil	Sigma
Valin	Merck
Yeast Nitrogen Base	Difco
Zinkchlorid	Merck

4.5.4 Enzyme

Name des Enzyms	Bezugsquelle
Lysing Enzymes	Sigma
Lysozym	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Pfx-DNA-Polymerase	Invitrogen
Phusion-Polymerase	Finnzymes
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, New England Biolabs (Schwalbach)
RNaseA	Serva (Heidelberg)
Shrimp Alkalische Phosphatase	Fermentas
T4-DNA-Ligase	Roche (Mannheim)
Taq-Polymerase	Laborpräparation

Literaturverzeichnis

- Abramoff, M. D., Magelhaes, P. J. and Ram, S. J. (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, **11**, 36–42.
- Aghazadeh, B., Zhu, K., Kubiseski, T. J., Liu, G. A., Pawson, T., Zheng, Y. and Rosen, M. K. (1998) Structure and mutagenesis of the Dbl homology domain. *Nat Struct Biol*, **5**, 1098–1107.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1989) Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 5878–5882.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1994) Identification of *fuz7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for α -locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. *Genes Dev*, **8**, 1367–1378.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1996) Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development*, **122**, 2965–2976.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (2002) Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol*, **37**, 149–170.
- Bao, M. Z., Shock, T. R. and Madhani, H. D. (2010) Multisite phosphorylation of the *Saccharomyces cerevisiae* filamentous growth regulator Tec1 is required for its recognition by the E3 ubiquitin ligase adaptor Cdc4 and its subsequent destruction in vivo. *Eukaryot Cell*, **9**, 31–36.
- Barale, S., McCusker, D. and Arkowitz, R. A. (2006) Cdc42p GDP/GTP cycling is necessary for efficient cell fusion during yeast mating. *Mol Biol Cell*, **17**, 2824–2838.
- Bell, J. (1989) The polymerase chain reaction. *Immunol Today*, **10**, 351–5.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513–23.
- Bishop, A. C., Shah, K., Liu, Y., Witucki, L., Kung, C. and Shokat, K. M. (1998) Design of allele-specific inhibitors to probe protein kinase signaling. *Curr Biol*, **8**, 257–266.
- Bölker, M., Urban, M. and Kahmann, R. (1992) The α mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell*, **68**, 441–450.
- Bose, I., Irazoqui, J. E., Moskow, J. J., Bardes, E. S., Zyla, T. R. and Lew, D. J. (2001) Assembly of scaffold-mediated complexes containing Cdc42p, the exchange factor Cdc24p, and the effector Cla4p required for cell cycle-regulated phosphorylation of Cdc24p. *J Biol Chem*, **276**, 7176–7186.

- Boulter, E., Garcia-Mata, R., Guilluy, C., Dubash, A., Rossi, G., Brennwald, P. J. and Burridge, K. (2010) Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1. *Nat Cell Biol*, **12**, 477–483.
- Bourne, H. R. (1997) G proteins. The arginine finger strikes again. *Nature*, **389**, 673–674.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A. and McCormick, F. (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, **348**, 125–32.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A. and McCormick, F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, **349**, 117–27.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C. and Feldbrügge, M. (2004) A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics*, **272**, 216–226.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kämper, J. and Kahmann, R. (2001) Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **42**, 1047–1063.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248–254.
- Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A. and Kahmann, R. (2009) *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annu Rev Phytopathol*, **47**, 423–445.
- Brown, J. L., Jaquenoud, M., Gulli, M. P., Chant, J. and Peter, M. (1997) Novel Cdc42-binding proteins Gic1 and Gic2 control cell polarity in yeast. *Genes Dev*, **11**, 2972–2982.
- Burridge, K. and Wennerberg, K. (2004) Rho and Rac take center stage. *Cell*, **116**, 167–79. 0092-8674 Comment Journal Article Review.
- Buttery, S. M., Yoshida, S. and Pellman, D. (2007) Yeast formins Bni1 and Bnr1 utilize different modes of cortical interaction during the assembly of actin cables. *Mol Biol Cell*, **18**, 1826–1838.
- Cales, C., Hancock, J. F., Marshall, C. J. and Hall, A. (1988) The cytoplasmic protein GAP is implicated as the target for regulation by the ras gene product. *Nature*, **332**, 548–51.
- Carol, R. J., Takeda, S., Linstead, P., Durrant, M. C., Kakesova, H., Derbyshire, P., Drea, S., Zarsky, V. and Dolan, L. (2005) A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells. *Nature*, **438**, 1013–1016.
- Casamayor, A. and Snyder, M. (2002) Bud-site selection and cell polarity in budding yeast. *Curr Opin Microbiol*, **5**, 179–86.
- Castagnetti, S., Novák, B. and Nurse, P. (2007) Microtubules offset growth site from the cell centre in fission yeast. *J Cell Sci*, **120**, 2205–2213.
- Castillo-Lluva, S., Alvarez-Tabarés, I., Weber, I., Steinberg, G. and Pérez-Martín, J. (2007) Sustained cell polarity and virulence in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* depends on an essential cyclin-dependent kinase from the Cdk5/Pho85 family. *J Cell Sci*, **120**, 1584–1595.
- Caviston, J. P., Longtine, M., Pringle, J. R. and Bi, E. (2003) The role of Cdc42p GTPase-activating proteins in assembly of the septin ring in yeast. *Mol Biol Cell*, **14**, 4051–4066.

- Chang, E. C., Barr, M., Wang, Y., Jung, V., Xu, H. P. and Wigler, M. H. (1994) Cooperative interaction of *S. pombe* proteins required for mating and morphogenesis. *Cell*, **79**, 131–141.
- Chant, J., Mischke, M., Mitchell, E., Herskowitz, I. and Pringle, J. R. (1995) Role of Bud3p in producing the axial budding pattern of yeast. *J Cell Biol*, **129**, 767–78.
- Chant, J. and Pringle, J. R. (1995) Patterns of bud-site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **129**, 751–65. 0021-9525 Journal Article.
- Chen, J., Zheng, W., Zheng, S., Zhang, D., Sang, W., Chen, X., Li, G., Lu, G. and Wang, Z. (2008) Rac1 is required for pathogenicity and Chm1-dependent conidiogenesis in rice fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. *PLoS Pathog*, **4**, e1000202.
- Church, G. M. and Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 1991–1995.
- Cole, K. C., Barbour, J.-E. R., Midkiff, J. F., Marble, B. M. and Johnson, D. I. (2009) Multiple proteins and phosphorylations regulate *Saccharomyces cerevisiae* Cdc24p localization. *FEBS Lett*, **583**, 3339–3343.
- Coll, P. M., Trillo, Y., Ametzazurra, A. and Perez, P. (2003) Gef1p, a new guanine nucleotide exchange factor for Cdc42p, regulates polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*, **14**, 313–323.
- Cowan, C. R. and Hyman, A. A. (2007) Acto-myosin reorganization and PAR polarity in *C. elegans*. *Development*, **134**, 1035–1043.
- Das, M., Wiley, D. J., Medina, S., Vincent, H. A., Larrea, M., Oriolo, A. and Verde, F. (2007) Regulation of cell diameter, For3p localization, and cell symmetry by fission yeast Rho-GAP Rga4p. *Mol Biol Cell*, **18**, 2090–2101.
- Deshaies, R. J. and Joazeiro, C. A. P. (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem*, **78**, 399–434.
- Dümmler, A., Lawrence, A.-M. and de Marco, A. (2005) Simplified screening for the detection of soluble fusion constructs expressed in *E. coli* using a modular set of vectors. *Microb Cell Fact*, **4**, 34.
- Dong, Y., Pruyne, D. and Bretscher, A. (2003) Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of Rho signaling in yeast. *J Cell Biol*, **161**, 1081–1092.
- Ebnet, K., Iden, S., Gerke, V. and Suzuki, A. (2008) Regulation of epithelial and endothelial junctions by PAR proteins. *Front Biosci*, **13**, 6520–6536.
- Endo, M., Shirouzu, M. and Yokoyama, S. (2003) The Cdc42 binding and scaffolding activities of the fission yeast adaptor protein Scd2. *J Biol Chem*, **278**, 843–852.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature*, **420**, 629–635.
- Feierbach, B. and Chang, F. (2001) Roles of the fission yeast formin for3p in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. *Curr Biol*, **11**, 1656–1665.

- Freitag, J., Lanver, D., Böhmer, C., Schink, K. O., Bölker, M. and Sandrock, B. (2011) Septation of infectious hyphae is critical for appressoria formation and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog*, **7**, e1002044.
- Gao, Y., Xing, J., Streuli, M., Leto, T. L. and Zheng, Y. (2001) Trp(56) of *rac1* specifies interaction with a subset of guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem*, **276**, 47530–47541.
- García-Mata, R. and Burridge, K. (2007) Catching a GEF by its tail. *Trends Cell Biol*, **17**, 36–43.
- García-Pedrajas, M. D., Nadal, M., Bölker, M., Gold, S. E. and Perlin, M. H. (2008) Sending mixed signals: redundancy vs. uniqueness of signaling components in the plant pathogen, *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol*, **45 Suppl 1**, S22–S30.
- Gibbs, J. B., Sigal, I. S., Poe, M. and Scolnick, E. M. (1984) Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic *ras* p21 molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 5704–8.
- Gibson, R. M. and Wilson-Delfosse, A. L. (2001) RhoGDI-binding-defective mutant of Cdc42Hs targets to membranes and activates filopodia formation but does not cycle with the cytosol of mammalian cells. *Biochem J*, **359**, 285–294.
- Glomset, J. A. and Farnsworth, C. C. (1994) Role of protein modification reactions in programming interactions between *ras*-related GTPases and cell membranes. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 181–205.
- Gültekin, H. and Heermann, K. H. (1988) The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal Biochem*, **172**, 320–329.
- Glynn, J. M., Lustig, R. J., Berlin, A. and Chang, F. (2001) Role of *bud6p* and *tea1p* in the interaction between actin and microtubules for the establishment of cell polarity in fission yeast. *Curr Biol*, **11**, 836–845.
- Goryachev, A. B. and Pokhilko, A. V. (2008) Dynamics of Cdc42 network embodies a Turing-type mechanism of yeast cell polarity. *FEBS Lett*, **582**, 1437–1443.
- Gérard, A., Mertens, A. E. E., van der Kammen, R. A. and Collard, J. G. (2007) The Par polarity complex regulates Rap1- and chemokine-induced T cell polarization. *J Cell Biol*, **176**, 863–875.
- Guipponi, M., Scott, H. S., Chen, H., Schebesta, A., Rossier, C. and Antonarakis, S. E. (1998) Two isoforms of a human intersectin (ITSN) protein are produced by brain-specific alternative splicing in a stop codon. *Genomics*, **53**, 369–376.
- Gulli, M. P., Jaquenoud, M., Shimada, Y., Niederhäuser, G., Wiget, P. and Peter, M. (2000) Phosphorylation of the Cdc42 exchange factor Cdc24 by the PAK-like kinase Cla4 may regulate polarized growth in yeast. *Mol Cell*, **6**, 1155–1167.
- Gulli, M. P. and Peter, M. (2001) Temporal and spatial regulation of Rho-type guanine-nucleotide exchange factors: the yeast perspective. *Genes Dev*, **15**, 365–379.
- Hayakawa, M., Kitagawa, H., Miyazawa, K., Kitagawa, M. and Kikugawa, K. (2005) The FWD1/ β -TrCP-mediated degradation pathway establishes a 'turning off switch' of a Cdc42 guanine nucleotide exchange factor, FGD1. *Genes Cells*, **10**, 241–251.

- Hayakawa, M., Matsushima, M., Hagiwara, H., Oshima, T., Fujino, T., Ando, K., Kikugawa, K., Tanaka, H., Miyazawa, K. and Kitagawa, M. (2008) Novel insights into FGD3, a putative GEF for Cdc42, that undergoes SCF(FWD1/beta-TrCP)-mediated proteasomal degradation analogous to that of its homologue FGD1 but regulates cell morphology and motility differently from FGD1. *Genes Cells*, **13**, 329–342.
- Heimel, K., Scherer, M., Schuler, D. and Kämper, J. (2010a) The *Ustilago maydis* Clp1 protein orchestrates pheromone and b-dependent signaling pathways to coordinate the cell cycle and pathogenic development. *Plant Cell*, **22**, 2908–2922.
- Heimel, K., Scherer, M., Vranes, M., Wahl, R., Pothiratana, C., Schuler, D., Vincon, V., Finkernagel, F., Flor-Parra, I. and Kämper, J. (2010b) The transcription factor Rbf1 is the master regulator for b-mating type controlled pathogenic development in *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog*, **6**.
- Hirota, K., Tanaka, K., Ohta, K. and Yamamoto, M. (2003) Gef1p and Scd1p, the Two GDP-GTP exchange factors for Cdc42p, form a ring structure that shrinks during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*, **14**, 3617–3627.
- Hlubek, A., Schink, K. O., Mahlert, M., Sandrock, B. and Bölker, M. (2008) Selective activation by the guanine nucleotide exchange factor Don1 is a main determinant of Cdc42 signalling specificity in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **68**, 615–623.
- Howell, A. S., Savage, N. S., Johnson, S. A., Bose, I., Wagner, A. W., Zyla, T. R., Nijhout, H. F., Reed, M. C., Goryachev, A. B. and Lew, D. J. (2009) Singularity in polarization: rewiring yeast cells to make two buds. *Cell*, **139**, 731–743.
- Iden, S. and Collard, J. G. (2008) Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 846–859.
- Irazoqui, J. E., Gladfelter, A. S. and Lew, D. J. (2003) Scaffold-mediated symmetry breaking by Cdc42p. *Nat Cell Biol*, **5**, 1062–1070.
- Iwase, M., Luo, J., Nagaraj, S., Longtine, M., Kim, H. B., Haarer, B. K., Caruso, C., Tong, Z., Pringle, J. R. and Bi, E. (2006) Role of a Cdc42p effector pathway in recruitment of the yeast septins to the presumptive bud site. *Mol Biol Cell*, **17**, 1110–1125.
- Joberty, G., Petersen, C., Gao, L. and Macara, I. G. (2000) The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol*, **2**, 531–539.
- Karnoub, A. E., Der, C. J. and Campbell, S. L. (2001) The insert region of Rac1 is essential for membrane ruffling but not cellular transformation. *Mol Cell Biol*, **21**, 2847–2857.
- Kemphues, K. (2000) PARsing embryonic polarity. *Cell*, **101**, 345–348.
- Kim, H., Yang, P., Catanuto, P., Verde, F., Lai, H., Du, H., Chang, F. and Marcus, S. (2003) The kelch repeat protein, Tea1, is a potential substrate target of the p21-activated kinase, Shk1, in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*, **278**, 30074–30082.
- Kim, S. H., Li, Z. and Sacks, D. B. (2000) E-cadherin-mediated cell-cell attachment activates Cdc42. *J Biol Chem*, **275**, 36999–37005.

- Klahre, U., Becker, C., Schmitt, A. C. and Kost, B. (2006) Nt-RhoGDI2 regulates Rac/Rop signaling and polar cell growth in tobacco pollen tubes. *Plant J*, **46**, 1018–1031.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.-J., Brefort, T., Saville, B. J., Banuett, F., Kronstad, J. W., Gold, S. E., Müller, O., Perlin, M. H., Wösten, H. A. B., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Peña, C. G., Snetselaar, K., McCann, M., Pérez-Martín, J., Feldbrügge, M., Basse, C. W., Steinberg, G., Ibeas, J. I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J. E., Sentandreu, R., González-Prieto, J. M., Kennell, J. C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greilinger, D., Münch, K., Rössel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandroock, B., Meng, S., Ho, E. C. H., Cahill, M. J., Boyce, K. J., Klose, J., Klosterman, S. J., Deelstra, H. J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P. H., Häuser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schlüter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Güldener, U., Münsterkötter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H.-W., Mauceli, E. W., DeCaprio, D., Wade, C. M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D. B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J. and Birren, B. W. (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, **444**, 97–101.
- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M. and Kahmann, R. (1995) Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell*, **81**, 73–83.
- Knaus, M., Pelli-Gulli, M.-P., van Drogen, F., Springer, S., Jaquenoud, M. and Peter, M. (2007) Phosphorylation of Bem2p and Bem3p may contribute to local activation of Cdc42p at bud emergence. *EMBO J*, **26**, 4501–4513.
- Kozma, R., Sarnier, S., Ahmed, S. and Lim, L. (1997) Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol Cell Biol*, **17**, 1201–1211.
- Kozubowski, L., Saito, K., Johnson, J. M., Howell, A. S., Zyla, T. R. and Lew, D. J. (2008) Symmetry-breaking polarization driven by a Cdc42p GEF-PAK complex. *Curr Biol*, **18**, 1719–1726.
- Kwon, M. J., Arentshorst, M., Roos, E. D., van den Hondel, C. A. M. J. J., Meyer, V. and Ram, A. F. J. (2011) Functional characterization of Rho GTPases in *Aspergillus niger* uncovers conserved and diverged roles of Rho proteins within filamentous fungi. *Mol Microbiol*, **79**, 1151–1167.
- Lamson, R. E., Winters, M. J. and Pryciak, P. M. (2002) Cdc42 regulation of kinase activity and signaling by the yeast p21-activated kinase Ste20. *Mol Cell Biol*, **22**, 2939–2951.
- Layton, A. T., Savage, N. S., Howell, A. S., Carroll, S. Y., Drubin, D. G. and Lew, D. J. (2011) Modeling vesicle traffic reveals unexpected consequences for Cdc42p-mediated polarity establishment. *Curr Biol*, **21**, 184–194.
- Lechler, T., Jonsdottir, G. A., Klee, S. K., Pellman, D. and Li, R. (2001) A two-tiered mechanism by which Cdc42 controls the localization and activation of an Arp2/3-activating motor complex in yeast. *J Cell Biol*, **155**, 261–70.
- Leveleki, L., Mahlert, M., Sandroock, B. and Bölker, M. (2004) The PAK family kinase Cla4 is required for budding and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **54**, 396–406.

- Lin, R., Bagrodia, S., Cerione, R. and Manor, D. (1997) A novel Cdc42Hs mutant induces cellular transformation. *Curr Biol*, **7**, 794–797.
- Liu, Y., Bishop, A., Witucki, L., Kraybill, B., Shimizu, E., Tsien, J., Ubersax, J., Blethrow, J., Morgan, D. O. and Shokat, K. M. (1999) Structural basis for selective inhibition of Src family kinases by PP1. *Chem Biol*, **6**, 671–678.
- Liu, Y., Shah, K., Yang, F., Witucki, L. and Shokat, K. M. (1998) Engineering Src family protein kinases with unnatural nucleotide specificity. *Chem Biol*, **5**, 91–101.
- Madrid, M., Soto, T., Khong, H. K., Franco, A., Vicente, J., Pérez, P., Gacto, M. and Cansado, J. (2006) Stress-induced response, localization, and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*, **281**, 2033–2043.
- Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandrock, B. and Bölker, M. (2006) Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **59**, 567–578.
- Marco, E., Wedlich-Söldner, R., Li, R., Altschuler, S. J. and Wu, L. F. (2007) Endocytosis optimizes the dynamic localization of membrane proteins that regulate cortical polarity. *Cell*, **129**, 411–422.
- Marinissen, M. J. and Gutkind, J. S. (2005) Scaffold proteins dictate Rho GTPase-signaling specificity. *Trends Biochem Sci*, **30**, 423–426.
- Martin, S. G. (2009) Microtubule-dependent cell morphogenesis in the fission yeast. *Trends Cell Biol*, **19**, 447–454.
- Martin, S. G., McDonald, W. H., Yates, J. R. and Chang, F. (2005) Tea4p links microtubule plus ends with the formin for3p in the establishment of cell polarity. *Dev Cell*, **8**, 479–491.
- Martin, S. G., Rincón, S. A., Basu, R., Pérez, P. and Chang, F. (2007) Regulation of the formin for3p by cdc42p and bud6p. *Mol Biol Cell*, **18**, 4155–4167.
- Masuda, T., Tanaka, K., Nonaka, H., Yamochi, W., Maeda, A. and Takai, Y. (1994) Molecular cloning and characterization of yeast rho GDP dissociation inhibitor. *J Biol Chem*, **269**, 19713–19718.
- Mata, J. and Nurse, P. (1997) tea1 and the microtubular cytoskeleton are important for generating global spatial order within the fission yeast cell. *Cell*, **89**, 939–949.
- Merla, A. and Johnson, D. I. (2000) The Cdc42p GTPase is targeted to the site of cell division in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Cell Biol*, **79**, 469–477.
- Merla, A. and Johnson, D. I. (2001) The *Schizosaccharomyces pombe* Cdc42p GTPase signals through Pak2p and the Mkh1p-Pek1p-Spm1p MAP kinase pathway. *Curr Genet*, **39**, 205–209.
- Minc, N., Bratman, S. V., Basu, R. and Chang, F. (2009) Establishing new sites of polarization by microtubules. *Curr Biol*, **19**, 83–94.
- Mionnet, C., Bogliolo, S. and Arkowitz, R. A. (2008) Oligomerization regulates the localization of Cdc24, the Cdc42 activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **283**, 17515–17530.

- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51**, 263–73.
- Nakagawa, M., Fukata, M., Yamaga, M., Itoh, N. and Kaibuchi, K. (2001) Recruitment and activation of Rac1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites. *J Cell Sci*, **114**, 1829–1838.
- Nash, P., Tang, X., Orlicky, S., Chen, Q., Gertler, F. B., Mendenhall, M. D., Sicheri, F., Pawson, T. and Tyers, M. (2001) Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. *Nature*, **414**, 514–521.
- Nern, A. and Arkowitz, R. A. (2000) Nucleocytoplasmic shuttling of the Cdc42p exchange factor Cdc24p. *J Cell Biol*, **148**, 1115–1122.
- Nichols, C. B., Perfect, Z. H. and Alspaugh, J. A. (2007) A Ras1-Cdc24 signal transduction pathway mediates thermotolerance in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, **63**, 1118–1130.
- Nishimura, T., Yamaguchi, T., Kato, K., Yoshizawa, M., Ichi Nabeshima, Y., Ohno, S., Hoshino, M. and Kaibuchi, K. (2005) PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nat Cell Biol*, **7**, 270–277.
- O’Donnel, K. L. and McLaughlin, D. (1984) Postmeiotic mitosis, basidiospore development, and septation in *Ustilago maydis*. *Mycologia*, **76**, 486–502.
- Onken, B., Wiener, H., Philips, M. R. and Chang, E. C. (2006) Compartmentalized signaling of Ras in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 9045–9050.
- Park, H.-O. and Bi, E. (2007) Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol Mol Biol Rev*, **71**, 48–96.
- Parrini, M. C., Sadou-Dubourgnoux, A., Aoki, K., Kunida, K., Biondini, M., Hatzoglou, A., Pouillet, P., Formstecher, E., Yeaman, C., Matsuda, M., Rossé, C. and Camonis, J. (2011) SH3BP1, an Exocyst-Associated RhoGAP, Inactivates Rac1 at the Front to Drive Cell Motility. *Mol Cell*, **42**, 650–661.
- Perez, P. and Rincón, S. A. (2010) Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem J*, **426**, 243–253.
- Peterson, J., Zheng, Y., Bender, L., Myers, A., Cerione, R. and Bender, A. (1994) Interactions between the bud emergence proteins Bem1p and Bem2p and Rho-type GTPases in yeast. *J Cell Biol*, **127**, 1395–1406.
- Pál, C., Papp, B. and Lercher, M. J. (2006) An integrated view of protein evolution. *Nat Rev Genet*, **7**, 337–348.
- Prehoda, K. E., Scott, J. A., Mullins, R. D. and Lim, W. A. (2000) Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASP-Arp2/3 complex. *Science*, **290**, 801–806.
- Raftopoulou, M. and Hall, A. (2004) Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol*, **265**, 23–32.

- Rittinger, K., Walker, P. A., Eccleston, J. F., Nurmahomed, K., Owen, D., Laue, E., Gamblin, S. J. and Smerdon, S. J. (1997a) Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP. *Nature*, **388**, 693–697.
- Rittinger, K., Walker, P. A., Eccleston, J. F., Smerdon, S. J. and Gamblin, S. J. (1997b) Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. *Nature*, **389**, 758–762.
- Romeis, T., Kämper, J. and Kahmann, R. (1997) Single-chain fusions of two unrelated homeodomain proteins trigger pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1230–1234.
- Rossman, K. L., Der, C. J. and Sondek, J. (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 167–180.
- Salazar, C. and Höfer, T. (2009) Multisite protein phosphorylation—from molecular mechanisms to kinetic models. *FEBS J*, **276**, 3177–3198.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463–7.
- Sasaki, T., Kikuchi, A., Araki, S., Hata, Y., Isomura, M., Kuroda, S. and Takai, Y. (1990) Purification and characterization from bovine brain cytosol of a protein that inhibits the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein. *J Biol Chem*, **265**, 2333–7.
- Schink, K. O. and Bölker, M. (2009) Coordination of cytokinesis and cell separation by endosomal targeting of a Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factor in *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell*, **20**, 1081–1088.
- Schmidt, A. and Hall, A. (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev*, **16**, 1587–1609.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I. and Kahmann, R. (1990) The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell*, **60**, 295–306.
- Schwamborn, J. C. and Püschel, A. W. (2004) The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat Neurosci*, **7**, 923–929.
- Seabra, M. C. and Wasmeier, C. (2004) Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 451–457.
- Sharp, P. A., Sugden, B. and Sambrook, J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose–ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*, **12**, 3055–63.
- Shen, Y., Li, N., Wu, S., Zhou, Y., Shan, Y., Zhang, Q., Ding, C., Yuan, Q., Zhao, F., Zeng, R. and Zhu, X. (2008) Nudel binds Cdc42GAP to modulate Cdc42 activity at the leading edge of migrating cells. *Dev Cell*, **14**, 342–353.

- Shimada, Y., Gulli, M. P. and Peter, M. (2000) Nuclear sequestration of the exchange factor Cdc24 by Far1 regulates cell polarity during yeast mating. *Nat Cell Biol*, **2**, 117–124.
- Sikorski, R. S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19–27.
- Slaughter, B. D., Das, A., Schwartz, J. W., Rubinstein, B. and Li, R. (2009) Dual modes of cdc42 recycling fine-tune polarized morphogenesis. *Dev Cell*, **17**, 823–835.
- Smith, D. G., Garcia-Pedrajas, M. D., Hong, W., Yu, Z., Gold, S. E. and Perlin, M. H. (2004) An *ste20* homologue in *Ustilago maydis* plays a role in mating and pathogenicity. *Eukaryot Cell*, **3**, 180–189.
- Smith, G. R., Givan, S. A., Cullen, P. and Sprague, G. F. (2002) GTPase-activating proteins for Cdc42. *Eukaryot Cell*, **1**, 469–480.
- Snaith, H. A., Samejima, I. and Sawin, K. E. (2005) Multistep and multimode cortical anchoring of *tea1p* at cell tips in fission yeast. *EMBO J*, **24**, 3690–3699.
- Snaith, H. A. and Sawin, K. E. (2003) Fission yeast *mod5p* regulates polarized growth through anchoring of *tea1p* at cell tips. *Nature*, **423**, 647–651.
- Snetselaar, Bolker and Kahmann (1996) *Ustilago maydis* Mating Hyphae Orient Their Growth toward Pheromone Sources. *Fungal Genet Biol*, **20**, 299–312.
- Snyder, J. T., Worthylake, D. K., Rossman, K. L., Betts, L., Pruitt, W. M., Siderovski, D. P., Der, C. J. and Sondek, J. (2002) Structural basis for the selective activation of Rho GTPases by Dbl exchange factors. *Nat Struct Biol*, **9**, 468–475.
- Southern, E. M. (1992) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. 1975. *Biotechnology*, **24**, 122–139.
- Stacey, D. W., Feig, L. A. and Gibbs, J. B. (1991) Dominant inhibitory Ras mutants selectively inhibit the activity of either cellular or oncogenic Ras. *Mol Cell Biol*, **11**, 4053–4064.
- Takahashi, K., Sasaki, T., Mammoto, A., Takaishi, K., Kameyama, T., Tsukita, S. and Takai, Y. (1997) Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J Biol Chem*, **272**, 23371–23375.
- Takaishi, K., Sasaki, T., Kotani, H., Nishioka, H. and Takai, Y. (1997) Regulation of cell-cell adhesion by *rac* and *rho* small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol*, **139**, 1047–1059.
- Takemoto, D., Kamakura, S., Saikia, S., Becker, Y., Wrenn, R., Tanaka, A., Sumimoto, H. and Scott, B. (2011) Polarity proteins Bem1 and Cdc24 are components of the filamentous fungal NADPH oxidase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 2861–2866.
- Tatebe, H., Nakano, K., Maximo, R. and Shiozaki, K. (2008) Pom1 DYRK regulates localization of the Rga4 GAP to ensure bipolar activation of Cdc42 in fission yeast. *Curr Biol*, **18**, 322–330.
- Terenna, C. R., Makushok, T., Velve-Casquillas, G., Baigl, D., Chen, Y., Bornens, M., Paoletti, A., Piel, M. and Tran, P. T. (2008) Physical mechanisms redirecting cell polarity and cell shape in fission yeast. *Curr Biol*, **18**, 1748–1753.

- Tippit, D. H., Fields, C. T., O'Donnell, K. L., Pickett-Heaps, J. D. and McLaughlin, D. J. (1984) The organization of microtubules during anaphase and telophase spindle elongation in the rust fungus *Puccinia*. *Eur J Cell Biol*, **34**, 34–44.
- Toenjes, K. A., Sawyer, M. M. and Johnson, D. I. (1999) The guanine-nucleotide-exchange factor Cdc24p is targeted to the nucleus and polarized growth sites. *Curr Biol*, **9**, 1183–1186.
- Tong, Z., Gao, X.-D., Howell, A. S., Bose, I., Lew, D. J. and Bi, E. (2007) Adjacent positioning of cellular structures enabled by a Cdc42 GTPase-activating protein-mediated zone of inhibition. *J Cell Biol*, **179**, 1375–1384.
- Virag, A., Lee, M. P., Si, H. and Harris, S. D. (2007) Regulation of hyphal morphogenesis by *cdc42* and *rac1* homologues in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, **66**, 1579–1596.
- Wahl, R., Zahiri, A. and Kämper, J. (2010) The *Ustilago maydis* b mating type locus controls hyphal proliferation and expression of secreted virulence factors in planta. *Mol Microbiol*, **75**, 208–220.
- Wai, S. C., Gerber, S. A. and Li, R. (2009) Multisite phosphorylation of the guanine nucleotide exchange factor Cdc24 during yeast cell polarization. *PLoS One*, **4**, e6563.
- Wang, T. and Bretscher, A. (1995) The rho-GAP encoded by BEM2 regulates cytoskeletal structure in budding yeast. *Mol Biol Cell*, **6**, 1011–1024.
- Wedlich-Söldner, R., Altschuler, S., Wu, L. and Li, R. (2003) Spontaneous cell polarization through actomyosin-based delivery of the Cdc42 GTPase. *Science*, **299**, 1231–1235.
- Wedlich-Söldner, R., Bölker, M., Kahmann, R. and Steinberg, G. (2000) A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J*, **19**, 1974–1986.
- Wedlich-Söldner, R., Wai, S. C., Schmidt, T. and Li, R. (2004) Robust cell polarity is a dynamic state established by coupling transport and GTPase signaling. *J Cell Biol*, **166**, 889–900.
- Weinzierl, G., Leveleki, L., Hassel, A., Kost, G., Wanner, G. and Bölker, M. (2002) Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **45**, 219–231.
- Weiss, E. L., Bishop, A. C., Shokat, K. M. and Drubin, D. G. (2000) Chemical genetic analysis of the budding-yeast p21-activated kinase Cla4p. *Nat Cell Biol*, **2**, 677–685.
- West, M., Kung, H. F. and Kamata, T. (1990) A novel membrane factor stimulates guanine nucleotide exchange reaction of ras proteins. *FEBS Lett*, **259**, 245–8. 0014-5793 Journal Article.
- White, T. J., Arnheim, N. and Erlich, H. A. (1989) The polymerase chain reaction. *Trends Genet*, **5**, 185–9.
- Wu, C., Lee, S. F., Furmaniak-Kazmierczak, E., Côté, G. P., Thomas, D. Y. and Leberer, E. (1996a) Activation of myosin-I by members of the Ste20p protein kinase family. *J Biol Chem*, **271**, 31787–31790.
- Wu, C., Lytvyn, V., Thomas, D. Y. and Leberer, E. (1997) The phosphorylation site for Ste20p-like protein kinases is essential for the function of myosin-I in yeast. *J Biol Chem*, **272**, 30623–30626.

- Wu, S. K., Zeng, K., Wilson, I. A. and Balch, W. E. (1996b) Structural insights into the function of the Rab GDI superfamily. *Trends Biochem Sci*, **21**, 472–476.
- Wu, Y. I., Frey, D., Lungu, O. I., Jaehrig, A., Schlichting, I., Kuhlman, B. and Hahn, K. M. (2009) A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature*, **461**, 104–108.
- Xu, H. and Wickner, W. (2006) Bem1p is a positive regulator of the homotypic fusion of yeast vacuoles. *J Biol Chem*, **281**, 27158–27166.
- Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Suzuki, A., Sugiyama, Y., Kitamura, K., Maniwa, R., Nagai, Y., Yamashita, A., Hirose, T., Ishikawa, H. and Ohno, S. (2001) PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex. *Genes Cells*, **6**, 721–731.
- Zhang, F. L. and Casey, P. J. (1996) Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem*, **65**, 241–269.
- Zhang, X., Bi, E., Novick, P., Du, L., Kozminski, K. G., Lipschutz, J. H. and Guo, W. (2001) Cdc42 interacts with the exocyst and regulates polarized secretion. *J Biol Chem*, **276**, 46745–46750.
- Zheng, Y., Cerione, R. and Bender, A. (1994) Control of the yeast bud-site assembly GTPase Cdc42. Catalysis of guanine nucleotide exchange by Cdc24 and stimulation of GTPase activity by Bem3. *J Biol Chem*, **269**, 2369–2372.
- Ziman, M., O'Brien, J. M., Ouellette, L. A., Church, W. R. and Johnson, D. I. (1991) Mutational analysis of CDC42Sc, a *Saccharomyces cerevisiae* gene that encodes a putative GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Mol Cell Biol*, **11**, 3537–3544.

Zitierte Dissertationen, Diplom- und Bachelorarbeiten

Andrea Hlubek, Dissertation, 2008,

Titel: „Die selektive Aktivierung der kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1 durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren bestimmt deren Signalspezifität in *Ustilago maydis*“

Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie, Genetik

Kay Schink, Dissertation, 2010,

Titel: „Funktionelle Analyse von Rho-spezifischen Guaninnukleotidaustauschfaktoren in *Ustilago maydis*“

Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie, Genetik

Annette Bauer, Dissertation, 2011,

Titel: „Die Rolle von Ras1 bei der Regulation des polaren Wachstums in *Ustilago maydis*“

Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie, Genetik

Sabrina Patzak, Diplomarbeit, 2007

Titel: „Regulation der Zellknospung durch Rsr1 in *Ustilago maydis*“

Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie, Genetik

Britta Tillmann, Diplomarbeit, 2008,

Titel: „Funktionelle Analyse des BAR-Domänen Rho-GEFs Hot1 in *Ustilago maydis*“

Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie, Genetik

Florian Rosenthal, Diplomarbeit, 2009,

Titel: „Funktionelle Analyse des Endozytose-Gerüstproteins und Rho-GEFs Intersectin in *Ustilago maydis*“

Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie, Genetik

Julia Engel, Diplomarbeit, 2009,

Titel: „Chemisch-genetische Analyse der p21 aktivierten Kinase Cla4 in *Ustilago maydis*“

Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie, Genetik

Sandra Przybilla, Bachelorarbeit, 2009,

Titel: „Charakterisierung des GTPase aktivierenden Proteins Bem3 in *Ustilago maydis*“ Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie, Genetik

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
Cbx	Carboxin
CMAC	7-aminochloromethylcumarin
CRIB	Cdc42/Rac1 interactive binding domain
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DH	Dbl-homology domain
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dYT	<i>double yeast tryptone</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alteri
GAP	GTPase-Aktivierendes-Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HRP	Meerrettich Peroxidase
Hyg	Hygromycin
i.d.R.	in der Regel
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
LiT	Lithium-Acetat/Tris
m	mili
M	molar
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>

4 Abkürzungen

μ	micro
n	nano
NAT	Nourseothricin
N-Terminus	Amino-Terminus
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600nm Wellenlänge
ORF	<i>open reading frame</i>
PAK	p21-aktivierte Kinase
PB1	Phox and Bem1 homology domain
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	Potato Dextrose
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PH	Pleckstrin homology domain
Phleo	Phleomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SC	<i>synthetic complete</i>
SCS	Natrium-Sorbitol-Puffer
SDS	Natriumdodecylsulfat
STC	Sorbitol-Tris-Kalcium-Puffer
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
YEP	<i>yeast extract</i> und <i>pepton</i>
YEPS	<i>yeast extract</i> , <i>pepton</i> und <i>sucrose</i>
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp

Danksagung

Ich bedanke mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Michael Bölker für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Labor anfertigen zu dürfen und für all die Unterstützung, die er mir dabei bot.

Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch danke ich, dass er sich bereit erklärte, das Zweitgutachten für diese Arbeit zu übernehmen.

Ich bedanke mich auch bei Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl und Prof. Dr. Martin Thanbichler für die Bereitschaft meiner Prüfungskommission anzugehören.

Der International Max Planck Research School (IMPRS) Marburg und der Hessischen Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-ökonomischer Exzellenz (LOEWE) danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Michael Mahlert, Andrea Hlubek und Björn Sandrock danke ich für all die Arbeit, die sie in unser GTPasen Projekt investierten und auf der ich aufbauen durfte. Meinen Mitstreitern bei den „GEFs-ketieren“, Kay Schink und Britta Tillmann danke ich ganz besonders für die gute Zusammenarbeit und rufe ihnen zu: „Ein GEF für alle GTPasen, alle GTPasen für einen GEF“. Beate Teichmann und Michaela Wehr danke ich für all die Aufmunterung im Labor und die lustigen Kaffeepausen, der Laboralltag wäre ohne sie nie so schön gewesen. Annette Bauer und Johannes Freitag danke ich für die Diskussionen auf der Rampe und in der Küche. Sie haben mit vielen guten Ratschlägen meine Projekte vorangebracht. Bei meinen „Küken“, meinen Diplom- und Masterstudenten Britta Tillmann, Florian Rosenthal, Nicole Gutjahr und Christopher Meusel, bedanke ich mich für ihr Engagement, es war eine Freude sie zu betreuen. Auch gilt mein Dank Ute Kämper, Christian Böhmer, Darius Stausberg, Lidan Liu, Sabrina Patzak, Stefan Ahrens, Julia Engel, Julia Ast, Sandra Przybilla, Annemarie Heskamp und allen anderen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für die wunderbare Zeit, die wir zusammen hatten.

Marisa Piscator und Hanne Steinebach danke ich für ihr Organisationstalent und dafür, dass sie den „Laden am laufen halten“. Silke Fröhlich danke ich für ihre engagierte Mitarbeit während des letzten Jahres. Bei Heide-Barbara Böttner und Birgit Niedziella möchte ich mich für all die Unterstützung bei den administrativen Herausforderungen

4 Danksagung

des Wissenschaftlerlebens bedanken.

Ich danke allen Mitgliedern der AG Mösch für die gute Zusammenarbeit, besonders Christof Taxis für die Hilfe beim Mikroskopieren und bei der Chemocam. Marc Jungbluth, Raphael Birke, Christian Renicke, Diana Kruhl und Rike Diderrich danke ich für die lustigen Mittagspausen.

Bettina Bonn, Sandra Kern und meinen anderen Freunden in Marburg danke ich für ihre Aufmunterung und Unterstützung. Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die immer für mich da war und mir den Rücken stärkte.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Sonja Helene Frieser, geboren am 10.10.1981 in Wiesbaden, dass ich meine Dissertation mit dem Titel "**Die dynamische Regulation der kleinen GTPase Rac1 während des polaren Wachstums von *Ustilago maydis***" selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der aufgeführten Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht.

Marburg/Lahn, 24. Januar 2012

Sonja Frieser